

DIE HYDROXYLIERUNG VON ANDROGENEN

IN VIVO UND IN VITRO UNTERSUCHUNGEN

MIT HILFE

TRITIUM-MARKIERTER SUBSTRATE DURCH HTO-BILDUNG

INAUGURAL - DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DES

FACHBEREICHES PHARMAZIE

DER

FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON

URSULA LEMM

AUS

POSCHETZAU/KARLSBAD

BERLIN 1976

DIE HYDROXYLIERUNG VON ANDROGENEN

IN VIVO UND IN VITRO UNTERSUCHUNGEN

MIT HILFE

TRITIUM-MARKIERTER SUBSTRATE DURCH HTO-BILDUNG

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
DES
FACHBEREICHES PHARMAZIE
DER
FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
URSULA LEMM

AUS
POSCHETZAU/KARLSBAD

BERLIN 1976



1. Gutachter: Prof. Dr. M. Wenzel
2. Gutachter: Prof. Dr. R. Maurer
3. Gutachter: Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der Promotion: 13. April 1976

FÜR
WILFRIED



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548817_0098

Die vorliegende Arbeit wurde in der Radioisotopenabteilung des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Wenzel durchgeführt.

Für das fördernde Interesse an dieser Arbeit, die zahlreichen klärenden Diskussionen sowie die stete Hilfsbereitschaft möchte ich

Herrn Prof. Dr. M. Wenzel

herzlich danken.

Mein Dank gilt außerdem meinen Eltern, die mir das Studium der Pharmazie ermöglicht haben.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Literaturübersicht	3
C. Ergebnisse	10
1. Die Hydroxylierung von Androgenen in Ratten - in vitro Versuche	10
1.1. Die 2 α -Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in Rattenleber σ' - biochemische Parameter und Metaboliten- identifizierung	10
1.1.1. Zeit- und Gewebemengeabhängigkeit	12
1.1.2. Einfluß von N ₂ , O ₂ , KCN	15
1.1.3. K _m -Wert-Bestimmung	17
1.1.4. Coenzymspezifität	17
1.1.5. Identifizierung von 2 α -OH-Testosteron	21
1.1.6. Parallelität der Befunde mit ³ H- und ¹⁴ C-markiertem Testosteron	25
1.2. Die HTO-Bildung aus [5 α -T]-Dihydrotestosteron - eine Hydroxylierung oder Dehydrierung?	33
1.2.1. Versuche zur Charakterisierung einer enzymatischen Reaktion in Rattenorganen	34
1.2.2. Zellfraktionierung und Coenzymspezifität	41

2. Biologische Bedeutung der 2 α -Hydroxylierung in Ratten und Meerschweinchen - in vivo und in vitro Versuche	44
2.1. Sexualspezifität in vivo	44
2.2. Altersabhängigkeit	49
2.3. Organspezifität	55
2.4. Inhibierung der Hydroxylierung durch Metopiron und Cyproteronacetat	62
2.5. Einfluß von Hunger und Schädigung der Leber durch CCl ₄ auf die Hydroxylase-Aktivität	67
D. Diskussion der Ergebnisse	74
E. Zusammenfassung	88
F. Material und Methodik	90
G. Literaturverzeichnis	104

A. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Jede Naturwissenschaft besteht notwendigerweise aus drei Dingen: den Tatsachen, welche die Wissenschaft aufbauen, den Ideen, die sie hervorrufen, und den Worten, die sie ausdrücken.

Lavoisier (1787)

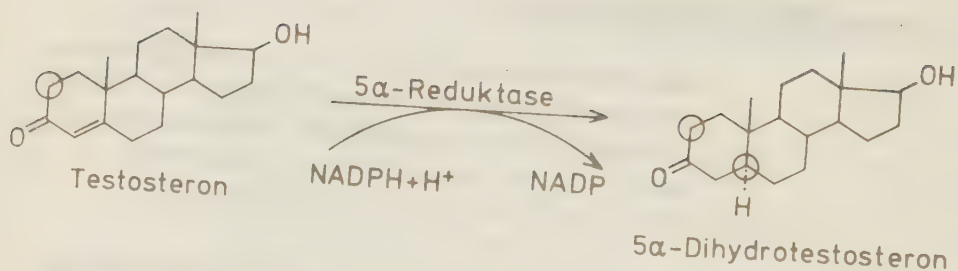
Hormone sind Substanzen, die im Organismus von innersekretorischen Drüsen gebildet werden. Nach Absonderung in die Blutbahn gelangen sie an den Ort ihrer spezifischen Wirkung, wo sie in kleinsten Mengen Stoffwechselvorgänge steuern. Nach Erfüllung ihrer Aufgaben werden sie durch enzymatische Prozesse abgebaut und ausgeschieden.

Ihrer chemischen Natur entsprechend fallen bei den Hormonen zwei große Gruppen auf: Steroide und Peptide. Die geschlechtsspezifischen Hormone gehören zur Gruppe der Steroide. Testosteron ist das wichtigste männliche, Östradiol das typisch weibliche Hormon.

Um die Wirkungsweise von Hormonen aufzuklären, befaßt sich die Steroid-Forschung gegenwärtig mit unterschiedlichen Arbeitsgebieten:

1. Die Bindung von Steroiden an sogenannte "Rezeptoren" im Erfolgsorgan und ihre primäre Wirkung
2. Die biochemischen Vorgänge, die im Organismus durch Steroide gesteuert und beeinflußt werden
3. Die Verstoffwechselung von Steroiden

In den zuletzt genannten Bereich fällt das Thema der vorliegenden Arbeit: Der enzymatische Abbau von Testosteron und seiner im Ring A gesättigten Form 5 α -Dihydrotestosteron an den Positionen 2 und 5 in Ratten und Meerschweinchen.



Für die Untersuchungen sollen T- und ^{14}C -markierte Substrate eingesetzt werden. Ihre Verwendung hat den Vorteil, daß mit Hilfe der verschiedenen Meßmethoden für radioaktive Strahlung noch kleinste Substanzmengen nachweisbar sind. Durch in vivo und in vitro Versuche sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Läßt sich die "stoffwechsel-labile Tritiummarkierung" zur exakten Bestimmung der Hydroxylierungsrate bei Androgenen anwenden?
2. Welche kinetischen Charakteristika weist die 2α-Hydroxylierung auf?
3. Ist die Hydroxylierung abhängig von Alter und Geschlecht? Welche Unterschiede existieren bei verschiedenen Tierspezies? In welchen Organen tritt sie bevorzugt auf? Durch welche Faktoren ist sie zu beeinflussen?

Zum Schluß soll anhand der Versuchsergebnisse die biologische Bedeutung der untersuchten enzymatischen Reaktion in Zusammenhang mit der Literatur diskutiert werden.

B. LITERATURÜBERSICHT

Für eine sinnvolle Regulation der Sexualfunktionen im männlichen Organismus durch Testosteron sind möglicherweise bestimmte Umwandlungsreaktionen dieses Steroids in Stoffwechsel- und Erfolgsorganen notwendig. Durch enzymatische Prozesse kommt es zur Bildung von Oxidations- und Reduktionsprodukten, was Inaktivierung ebenso wie Aktivierung des Hormons bedeuten kann.

Im Testosteronstoffwechsel entstehen Metabolite durch

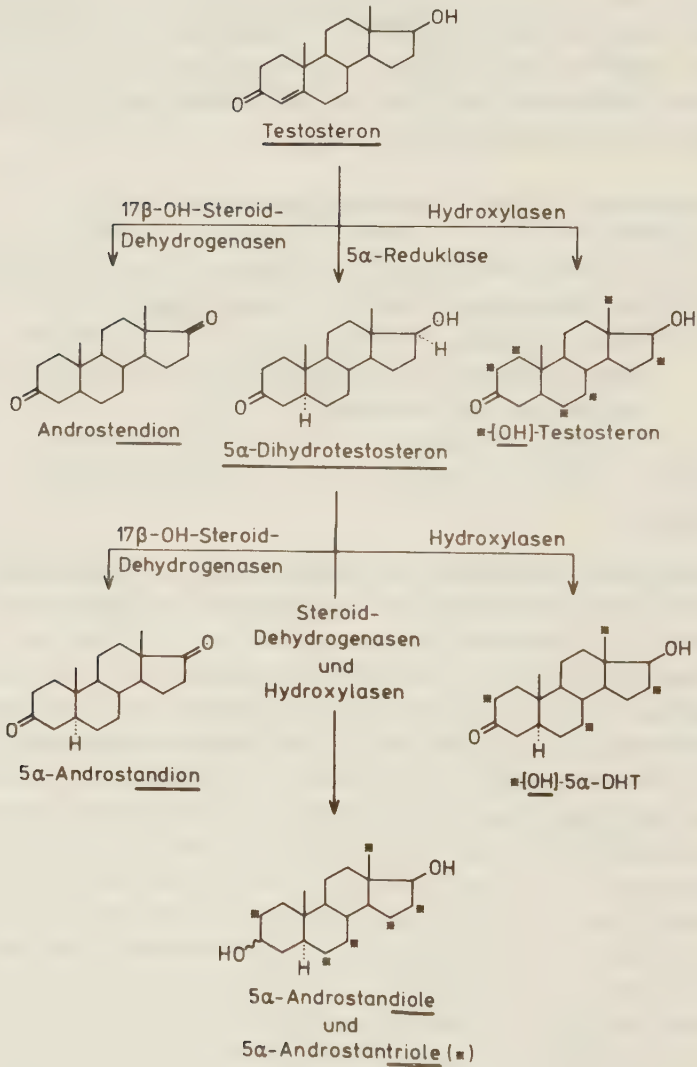
1. α - oder β -Reduktion von Ring A
2. α - oder β -Reduktion der 3-Ketogruppe
3. Oxidation der 17β -OH-Gruppe
4. Hydroxylierung verschiedener C-Atome und nachfolgende Oxidation der OH-Produkte
5. Konjugat-Bildung

$\Delta 4$ -Reduktasen

Der wichtigste und deshalb am häufigsten untersuchte Metabolisierungsschritt im Stoffwechsel des Testosteron ist zweifellos die Reduktion der $\Delta 4$ -en-Bindung in Ring A. McGuire und Tomkins entdeckten als erste im Jahre 1957 diese Umwandlungsreaktion bei verschiedenen Steroiden mit einer 3-Oxo-4-en-Gruppierung und wiesen in Rattenlebermikrosomen die Reduktion der Doppelbindung durch photometrische Messungen nach (1 - 4). Sie waren überzeugt, daß das Vorkommen der $\Delta 4$ -3-Keto-steroid-5 α -Reduktase auf die Leber beschränkt und für die Hormonwirkung bedeutungslos sei (5).

Später wurde dann die Hydrierung des Testosteron zum 5 α -Dihydrotestosteron außer in Lebermikrosomen in verschiedenen anderen Rattenorganen wie Testis (6), Niere (7 - 8), Nebenniere (9), Haut (10 - 11), Samenblase (12), Hypophyse und Hypothalamus (13 - 16) untersucht. Darüberhinaus ist dieses Enzym beschrieben in menschlichem Fötus (17) sowie in der Nebenniere von Meerschweinchen (18).

WICHTIGSTE STOFFWECHSELWEGE VON TESTOSTERON



Zahlreiche Veröffentlichungen beziehen sich auf die Eigenschaften und die intrazelluläre Verteilung des Enzyms in Ratten-Prostata (19 - 24). Biologische Tests ergaben, daß 5 α -Dihydrotestosteron eine höhere androgene Wirksamkeit besitzt als Testosteron selbst (25 - 27). In diesem Zusammenhang sind Studien über den Metabolismus von Testosteron in gesunder und krankhaft veränderter menschlicher Prostata von besonderem Interesse (28 - 33).

Eine außergewöhnliche Eigenschaft der 5 α -Reduktase ist die Irreversibilität der durch sie katalysierten Reaktion: Eine Wiedereinführung der 4,5-Doppelbindung z.B. beim 5 α -Dihydrotestosteron ist bisher nicht beobachtet worden. Zwar isolierten Levy und Talalay aus Bakterienstämmen von *Pseudomonas* Testosteron-Dehydrogenasen, durch welche in verschiedene Androgene 1,2- und 4,5-Doppelbindungen eingeführt wurden (34 - 36). Allerdings ist es bisher nicht gelungen, diese Reaktionen im tierischen Organismus nachzuvollziehen. Ein Versuch dazu soll in der vorliegenden Arbeit geleistet werden.

Hydroxysteroid-Dehydrogenasen

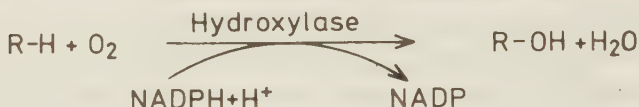
Im Gegensatz zur 5 α -Reduktase sind die Hydroxysteroid-Dehydrogenasen nur an reversiblen Umwandlungen beteiligt. Sie katalysieren am Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron Oxidoreduktionen in den Positionen 3 und 17.

Alle Reaktionsprozesse benötigen als Coenzyme entweder NAD(H) oder NADP(H) (37).

Durch Dehydrierung der 17 β -OH-Gruppe von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron entstehen Androstendion und 5 α -Androstendion. Die Reduktion der 3-Oxo-Gruppe zu den entsprechenden α - oder β -Alkoholen ist erst nach Hydrierung der 4,5-Doppelbindung möglich. Es werden 3 α (β)-5 α -Androstandiol und 3 α (β)-OH-5 α -Androstan-17-on gebildet. Diese Metabolite wurden nachgewiesen in Lebermikrosomen und Cytoplasma (37 - 38), Prostata (19) und Testis (6) von Ratten.

Hydroxylasen

Die Hydroxylierung von Steroiden wird durch sogenannte "Monooxygenasen" katalysiert. Dies sind Multi-Enzym-Komplexe, die neben dem eigentlichen Proteinanteil noch ein Hämprotein, das Cytochrom P-450 sowie ein Flavoprotein und ein Nicht-Häm-Eisen-Protein enthalten. An der Reaktion sind außer Enzym und Substrat noch ein Wasserstoffdonator sowie molekularer Sauerstoff beteiligt.



Zur Bildung der Hydroxylgruppe wird nur ein Sauerstoffatom verbraucht, das andere wird zu Wasser reduziert. Als Wasserstoffdonatoren dienen NADPH oder NADH. Der im folgenden beschriebene Reaktionsverlauf gilt als teilweise bewiesen (39 - 42):

Wie bei jeder enzymatischen Reaktion wird zu Beginn der Enzym-Substrat-Komplex gebildet. Nach Ullrich (39) wird im nächsten Schritt molekularer Sauerstoff an das zweiwertige Eisen des Cytochrom P-450 fixiert und durch Übertragung von zwei Elektronen aktiviert. Ein Sauerstoffatom wird nach Aufnahme eines Protons als OH^- abgespalten, während das andere als Bestandteil der Hydroxylgruppe in das Substrat eingebaut wird. Nach der Hydroxylierung bleibt das Cytochrom P-450 in seiner oxidierten Form zurück und muß wieder in die reduzierte sauerstoffaffinitäts Form umgewandelt werden. An diesem letzten Schritt ist eine Redoxkette aus einem Flavoprotein und einem Nicht-Häm-Eisen-Protein beteiligt.

Hauptort der Steroid-Inaktivierung durch Hydroxylierung und Bildung von Konjugaten wie Steroid-Sulfaten und -Glucuroniden ist die Leber. Sie enthält im Vergleich zu anderen Organen sehr viel Cytochrom P-450, so daß die sehr geringe Reaktionsgeschwindigkeit, bedingt durch die niedrige Wechselzahl 10, ausgeglichen wird (42).

Die Hydroxylierung verläuft stereospezifisch (40), jedoch finden wir im Gegensatz zu anderen mikrosomalen Enzymsystemen der Leber eine extrem geringe Substratspezifität. Untersuchungen über Enzym-Induktion und -Inhibition sprechen dafür, daß Androgen-Hydroxylasen mit den mikrosomalen Arzneimittel-Hydroxylasen identisch sind (44 - 45).

Charakteristisch für den Steroid-Abbau sind geschlechtsspezifische Unterschiede, die sowohl quantitativer als auch qualitativer Art sein können (38, 46 - 49).

In männlichen Rattenlebermikrosomen entstehen aus Testosteron Mono-Hydroxylierungsprodukte mit Sauerstofffunktionen in den Positionen 2 β , 6 α und 6 β , 7 α , 16 α und 18 (44, 50 - 54). Bemerkenswerterweise gelang es fast immer, die dem jeweiligen Hydroxy-Testosteron entsprechende Oxo-Verbindung zu isolieren (46).

5 α -Dihydrotestosteron wird zu 2 β , 7 α , 16 α und 18-OH-Verbindungen abgebaut (51, 55). Androstantrirole entstehen sowohl aus Testosteron als auch aus 5 α -Dihydrotestosteron (53, 55 - 56).

Außer in Ratten sind Androgen-Hydroxylasen in der Leber von Meerschweinchen (57), Mäusen (58) und menschlichem Fetus bekannt. In letzterem konnte für Testosteron außer den oben aufgeführten Enzymen eine 1 β - und 2 α -Hydroxylase nachgewiesen werden (59 - 60).

Einige der beschriebenen Inaktivierungsreaktionen scheinen nicht auf die Leber beschränkt zu sein. Z.B. sind 2 β - und 6 β -Hydroxylasen in der Prostata von Menschen und Ratten gefunden worden (28 - 29, 61). Außerdem ist in Ratten-Testis eine 7 α -Hydroxylase für Testosteron und Androstendion bekannt (62 - 64).

Wenig Aussagen gibt es über das Ausmaß der Hydroxylierung. Chamberlain, Jagarinec und Ofner (38) finden zwar nach Inkubation mit männlichen Rattenlebermikrosomen eine Hydroxylierungsrate von 69% bei Testosteron und 34% bei 5 α -Dihydrotestosteron, aber sie differenzieren die polaren Produkte nicht eingehender. Die Hauptaussage ist beschränkt auf die Tatsache, daß als Vorläufer der Hydroxylierung

ungsprodukte hauptsächlich im Ring A gesättigte Testosteronmetabolite in Frage kommen.

Ebenso geben Schriefers und Mitarbeiter (65) zwar absolute Mengen für die Summe aller aus Testosteron entstandenen Hydroxylierungsprodukte an, doch fehlt auch hier eine quantitative Auswertung der einzelnen Metabolite.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Eigenschaften der 2 α -Hydroxylase von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in Stoffwechsel- und Erfolgsorganen von Ratten und Meerschweinchen getestet und darüberhinaus der Hydroxylierungsgrad in vivo bestimmt werden.

Für den Wirkungsmechanismus des Testosteron in der Prostata scheiner hauptsächlich zwei Faktoren von Bedeutung zu sein: die Hydrierung durch die 5 α -Reduktase und die Bindung der Steroide an Rezeptor-Proteine (in keinem anderen Organ wurden Rezeptoren für 5 α -Dihydrotestosteron nachgewiesen (66)).

Nach dem Eindringen in die Zelle wird Testosteron im Cytoplasma an ein spezifisches "androphiles" Protein (Rezeptor) gebunden (67). Dieser Hormon-Protein-Komplex gelangt in den Zellkern, und das Testosteron wird in dieser Form im Chromatin zu 5 α -Dihydrotestosteron reduziert (19).

Während im Zellkern nur 5 α -Dihydrotestosteron und Testosteron nachgewiesen wurden, fanden Anderson und Liao (66) im cytoplasmatischen Raum außer Testosteron, 5 α -Dihydrotestosteron und Androstandiol noch weitere polare Metabolite. Diese Metabolisierung des 5 α -Dihydrotestosteron im Cytoplasma durch Hydroxysteroid-Dehydrogenasen bedeutet einerseits eine Inaktivierung, andererseits aber entstehen Abbauprodukte, die in Ergänzung zum 5 α -Dihydrotestosteron intrazelluläre Aufgaben zu erfüllen haben (67 - 71).

Biochemische Effekte der androgenen Wirksamkeit sind die Erhöhung der RNS-Polymerase-Aktivität und die dadurch bedingte Steigerung der Synthesen von Nucleinsäuren und Proteinen.

Biologisch von Bedeutung ist die Wirkung des 5 α -Dihydrotestosteron auf die Hyperplasie und Proliferation von Prostata-Zellen, während die Sekretion beeinflusst wird von Testosteron und Androstan-3 β ,17 β -diol (71 - 72).

Zusammenfassend kann man sagen, daß durch Katalyse der 5 α -Reduktase und der Steroid-Dehydrogenasen in den Erfolgsorganen aus Testosteron Metabolite entstehen, die im Hinblick auf die androgene Wirksamkeit ganz bestimmte, teilweise noch nicht endgültig aufgeklärte Funktionen zu erfüllen haben. Die Wirkung des Testosteron scheint also abzuhängen von der Konzentration und dem Zusammenspiel seiner Metabolite im Zielorgan (72 - 74).

In der Leber als Stoffwechselorgan bedeuten die reduktiven und oxidativen Veränderungen am Steroidmolekül eine Inaktivierung. In diesem Zusammenhang sind die Hydroxylierungsreaktionen von besonderer Bedeutung.

C. ERGEBNISSE

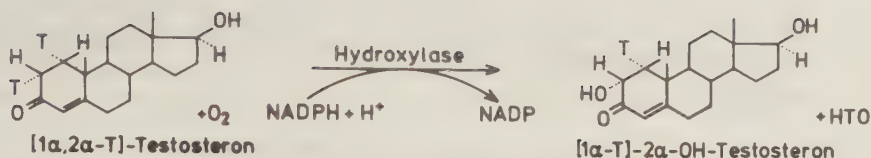
1. DIE HYDROXYLIERUNG VON ANDROGENEN IN RATTEN - IN VITRO VERSUCHE

1.1. Die 2 α -Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in Rattenleber ♂ - biochemische Parameter und Metabolitenidentifizierung

Frühere Untersuchungen über die Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron an C-2 in biologischem Material waren überwiegend beschränkt auf die Isolierung und Identifizierung der Reaktionsprodukte durch Massenspektrometrie und Gaschromatographie. Aufgrund der häufig sehr aufwendigen und komplizierten Auftrennung der bei der Inkubation entstandenen Metabolite war es schwer, Charakteristika wie z.B. K_m -Werte, Coenzympezifität etc. der enzymatischen Reaktion zu erarbeiten.

Eine neue und einfache Möglichkeit, die Hydroxylierungsrate und den Einfluß von biologischen und biochemischen Parametern auf die Hydroxylase-Aktivität zu bestimmen, ergibt sich durch die sogenannte "stoffwechsellabile Tritium-Markierung" (75 - 80). Verwendet man Substanzen, die an der zu hydroxylierenden Position Tritium (oder Deuterium) statt Wasserstoff tragen, so wird durch die Hydroxylierung das Tritium abgespalten und es entsteht als eines der Endprodukte der Reaktion HTO. Dabei müßte die Menge an gebildetem HTO der Menge an hydroxyliertem Produkt äquivalent sein.

Angewandt auf die spezielle Problemstellung der vorliegenden Arbeit bedeutet dies folgendes: Ist nach der Inkubation von [$1\alpha, 2\alpha$ -T]-Testosteron oder [$1\alpha, 2\alpha$ -T]-5 α -Dihydrotestosteron mit Rattenleber im Inkubationsansatz HTO enthalten, so ist dies sehr wahrscheinlich auf die Bildung von 2 α -OH-Testosteron oder 2 α -OH-5 α -Dihydrotestosteron zurückzuführen. Aufgrund des vermuteten Reaktionsmechanismus kann angenommen werden, daß die entstandene Hydroxylgruppe dieselbe sterische Position einnimmt wie das eliminierte Tritium.



Andere mögliche Reaktionen wie die Einführung einer $\Delta 1,2$ -Doppelbindung oder eine 1α -Hydroxylierung, die zu einer Tritium-Abspaltung führen könnten, werden zunächst ausgeschlossen.

Eine Dehydrierung von C-C-Bindungen am gesättigten Ring A von Steroiden ist bisher nur durch Mikroorganismen (34, 36), nicht aber im tierischen Organismus gelungen. Was die Hydroxylierung an C-1 betrifft, so ist weder für Testosteron noch für 5α -Dihydrotestosteron eine 1α -Hydroxylase in Rattenleber bekannt.

Eine wesentliche Voraussetzung für die praktische Durchführung dieser Methode ist die genaue Bestimmung der gebildeten HTO-Menge nach vollständiger Abtrennung von den Steroiden. Die Gefrierdestillation bietet sich als ein einfaches und zuverlässiges Verfahren an (siehe Methodik).

Bei der Berechnung der entstandenen Mole Hydroxylierungsprodukte ist zu berücksichtigen, daß an der HTO-Bildung nur eines der beiden im $[1\alpha,2\alpha-T]$ -Testosteron bzw. $[1\alpha,2\alpha-T]$ - 5α -Dihydrotestosteron befindlichen T-Atome beteiligt ist. Deshalb gibt das abgespaltene HTO (bezogen auf die eingesetzte Tritium-Aktivität) nur die Hälfte des tatsächlich entstandenen Hydroxylierungsproduktes an, und die Berechnung muß erfolgen nach der Formel:

$$\% \text{ Hydroxylierung} = \% \text{ HTO} \times 2.$$

Am Anfang unserer Untersuchungen stand die Klärung folgender Probleme:

1. Ist die HTO-Bildung aus [1 α ,2 α -T]-Testosteron bzw. [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron tatsächlich Folge einer enzymatischen Reaktion?
2. Wenn ja, handelt es sich um eine Hydroxylierung?

Zur Beantwortung der ersten Frage testeten wir die Abhängigkeit der Reaktion von der Inkubationszeit, der Gewebemenge und der Substratkonzentration. In Zusammenhang mit Frage 2 wurde der Einfluß von Sauerstoff, bestimmter Hemmstoffe und verschiedener Coenzyme untersucht.

1.1.1. Zeit- und Gewebemengeabhängigkeit

Der Umsatz bei enzymatischen Reaktionen hängt im allgemeinen ab von der Inkubationszeit und - Temperatur sowie von der Wasserstoffionenkonzentration. Ausschlaggebend sind ferner die eingesetzte Menge an Enzym und Substrat. Um unter physiologischen Bedingungen zu arbeiten, hielten wir die Inkubationstemperatur von 37°C und den pH-Wert von 7.4 konstant. Variiert wurden die Gewebemenge und Inkubationsdauer.

Gewebemengeabhängigkeit

Arbeitet man mit Substratüberschuß, so steigt die HTO-Bildung in Abhängigkeit von der zugesetzten Mikrosomenmenge an. Abb. 1 zeigt die Proportionalität bei Testosteron, eine Nicht-Linearität bei Dihydrotestosteron. Ab 50 mg Gewebemenge pro Ansatz erhöht sich bei beiden Steroiden die Reaktionsgeschwindigkeit trotz zunehmender Enzymkonzentration nicht mehr.

Zeitabhängigkeit

Untersucht man unter den Bedingungen gemäß Abb. 2 die Zeitabhängigkeit der Reaktion, so findet man eine lineare Beziehung zwischen

ABB. 1: HTO-BILDUNG AUS [1 α ,2 α -T]-TESTOSTERON UND [1 α ,2 α -T]-5 α -DHT- F(GEWEBEMENGE)

Lebermikrosomen (Ratten ♂) entsprechend einer Menge von 0,5 - 50 mg Gewebe wurden in 1.1 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) bei 37°C 10 Minuten mit NADPH ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) und den Steroiden (10^{-4} mol/l) inkubiert. (Mittelwerte $\pm$ SD von Vierfach-Bestimmungen)

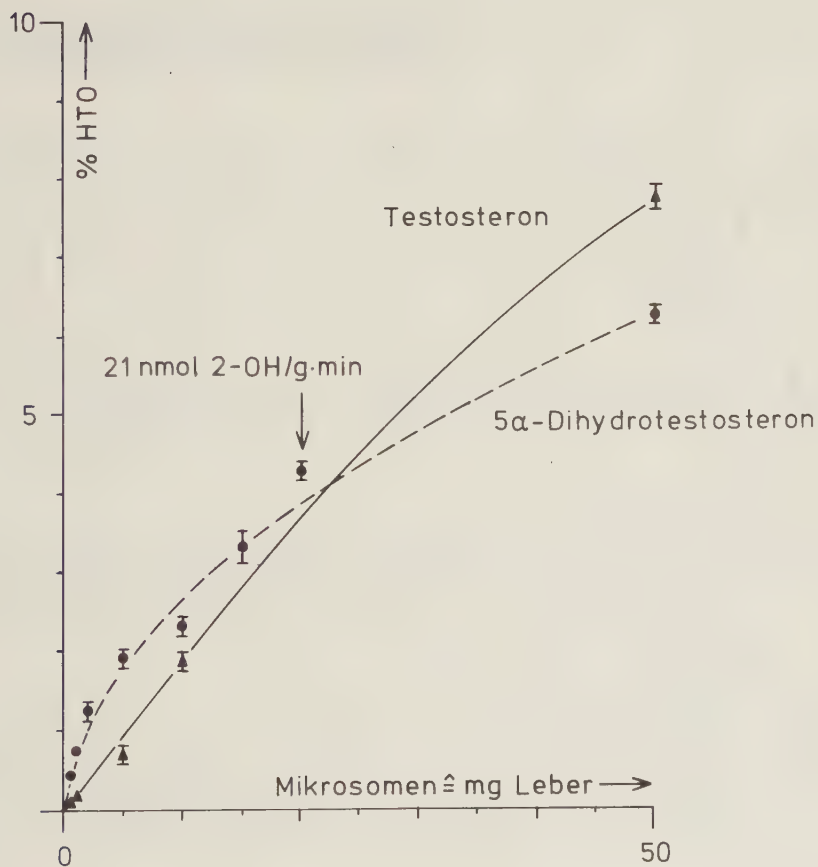
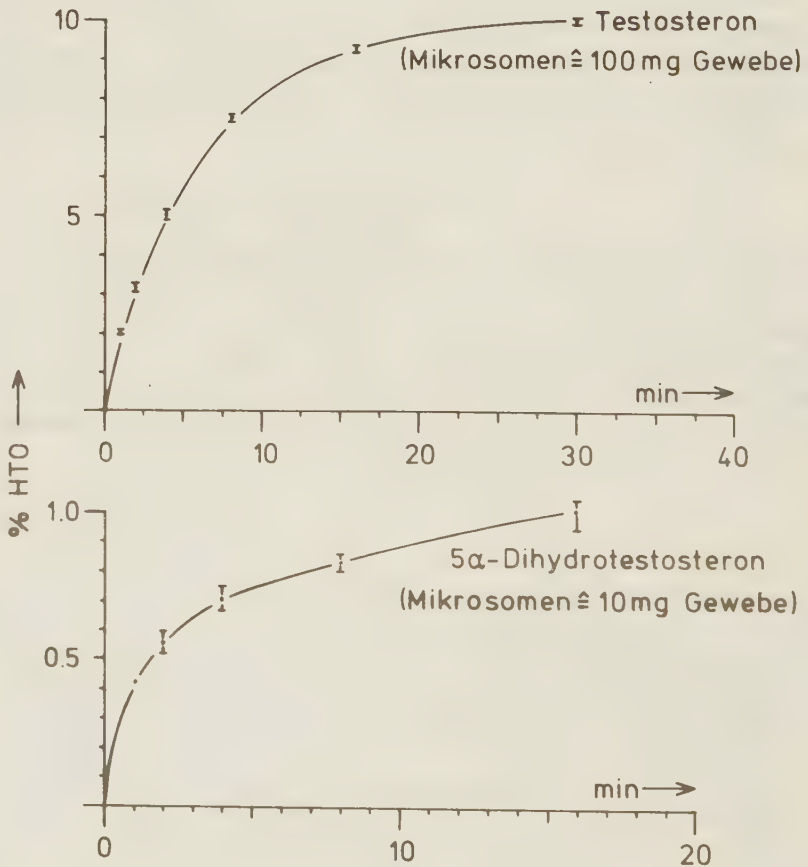


ABB. 2: HTO-BILDUNG AUS $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]$ -TESTOSTERON UND $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]$ - 5α -DHT - F(INKUBATIONSZEIT)

Lebermikrosomen (Ratten ♂) entsprechend 10 bzw. 100 mg Gewebe wurden in 1.1 ml TRIS-HCl-Puffer pH 7.4 mit $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]$ -Testosteron und $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]$ - 5α -DHT (10^{-4} mol/l) sowie NADPH ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) bei 37°C 1 - 30 Min. inkubiert (Mittelwerte $\pm \sigma$ für $n=4$).



HTO-Bildung und Inkubationszeit während der ersten Minuten. Die Inkubationsdauer wurde daher in der Regel nicht länger als 10 Minuten ausgedehnt.

1.1.2. Einfluß von N_2 , O_2 und KCN

Hydroxylierungsreaktionen laufen bekanntlich nur in Gegenwart von Sauerstoff ab. Die Reaktion müßte also unter Sauerstoffzufuhr verstärkt, in sauerstofffreiem Medium dagegen gar nicht nachzuweisen sein. Ein weiteres Charakteristikum für Hydroxylasen ist die Hemmbarkeit durch Kohlenmonoxid und Kaliumcyanid. Diese Inhibitoren blockieren das Cytochrom P-450 (81).

Grundsätzlich konnten wir feststellen, daß Testosteron und 5α -Dihydrotestosteron durch die unterschiedlichen Parameter in gleicher Weise beeinflusst werden. Wie aus Tab. 1 zu ersehen ist, wird bei der Inkubation von männlichen Leberschnitten in 95%iger Sauerstoffatmosphäre im Vergleich zu aeroben Bedingungen die HTO-Bildung aus $[1\alpha,2\alpha-T]$ -Testosteron um den Faktor 2.1 und aus $[1\alpha,2\alpha-T]$ - 5α -Dihydrotestosteron um den Faktor 1.4 (nicht dargestellt) gesteigert. Durch Sauerstoffentzug wird die HTO-Bildung um 95% gesenkt. Die geringe Restaktivität ist möglicherweise auf Spuren von Sauerstoff im Inkubationsansatz zurückzuführen.

Nach Zusatz von KCN als Hemmstoff verhalten sich Testosteron und 5α -Dihydrotestosteron unterschiedlich. Die HTO-Bildung aus 5α -Dihydrotestosteron wird um ca. 84% vermindert, während bei Testosteron die Hemmung nur 58% beträgt.

Die Versuchsergebnisse zeigen, daß die HTO-Bildung nicht auf einer unspezifischen Labilisierung des Tritium beruht, sondern Folge einer enzymatischen Reaktion ist. Die Hemmung durch Sauerstoffentzug und Kaliumcyanid sowie der Anstieg bei Begasen mit Sauerstoff sind typisch für Hydroxylasen, die Cytochrom P-450 enthalten.

TAB. 1: EINFLUSS VON N_2 , O_2 UND KCN AUF DIE HTO-BILDUNG AUS
[1 α ,2 α -T]-TESTOSTERON UND [1 α ,2 α -T]-5 α -DHT

100 mg Leberschnitte ♂ wurden in 1.1 ml Ringer- PO_4 -Puffer (pH 7.4) bei 37°C 10 Min. mit den Steroiden unter den angegebenen Bedingungen inkubiert (n = 4).

Steroid-Konz.: 10^{-5} mol/l

KCN-Konz.: 10^{-4} mol/l

*Steroid-Konz.: 10^{-4} mol/l

*KCN-Konz.: 10^{-3} mol/l

Inkubations- bedingungen		HTO-Bildung in % der Kontrolle		
		Testosteron	5 α -Dihydrotestosteron	
			I. Experiment*	II. Experiment
aerob		100	100	100
95% N_2 + 5% CO_2		4	7	-
95% O_2 + 5% CO_2		213	-	-
aerob + KCN		42	15	17
Kontrolle	HTO	7.4 ± 0.21	5.6 ± 0.11	7.4 ± 0.24
	% d.e.A.			
	OH-Prod.	1.47 ± 0.042	11.1 ± 0.22	1.47 ± 0.048
	$\frac{nmol}{g \cdot min}$			

1.1.3. K_m -Wert - Bestimmung

Im nächsten Schritt wird der Zusammenhang zwischen HTO-Bildung und Substratkonzentration geklärt. Da sich mit steigender Substratmenge auch die Reaktionsgeschwindigkeit erhöht, können aus der graphischen Darstellung der Versuchsergebnisse (Abb. 3a und 3b) Michaelis-Konstanten für die Tritium-Abspaltung aus $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]\text{-Testosteron}$ und $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]5\alpha\text{-Dihydrotestosteron}$ bestimmt werden. Für die Berechnung wurde angenommen, daß nur eines der beiden T-Atome aus dem Steroid entfernt wird unter Bildung eines $2\alpha\text{-Hydroxylierungsprodukts}$.

1.1.4. Coenzympezifität

Zur weiteren Charakterisierung des Enzymsystems sollen die beiden Fragen beantwortet werden: In welchen Kompartimenten der Zelle findet die beobachtete Reaktion statt, und welches Coenzym wird benötigt?

Nach Auftrennung des Leberhomogenats in Cytoplasma und Mikrosomen wird die HTO-Bildung in den isolierten Zellfraktionen gemessen. Außerdem läßt sich nach sorgfältigem Auswaschen der Mikrosomenfraktion von Coenzymen durch Zusatz von reduzierten und nicht reduzierten Pyridinnucleotiden bestimmen, welches als Cosubstrat für die zu untersuchende Reaktion bevorzugt wird.

Wie aus Tab. 2 hervorgeht, resultieren aus diesen Versuchsreihen die folgenden Befunde:

Die Kombination von Mikrosomen mit NADPH ergibt für Testosteron eine HTO-Bildung von 6.6% ($\hat{=}$ 2.63 nmol OH-Produkt/ g . min) und für $5\alpha\text{-Dihydrotestosteron}$ von 5% ($\hat{=}$ 2.02 nmol OH-Produkt/ g . min) der eingesetzten Aktivität. Dies entspricht in etwa den Werten, die mit der gleichen Menge Leberschnitte unter gleichen Bedingungen erzielt werden. Hauptort der Enzymaktivität ist somit die Mikrosomenfraktion. Wird dagegen NADH als Coenzym eingesetzt, so kann für $5\alpha\text{-Dihydrotestosteron}$ noch eine beträchtliche Tritium-Abspaltung gemessen werden, aus Testosteron dagegen wird kaum Tritium labilisiert.

ABB. 3A: K_M -WERT : 2α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON IN RATTEN ♂

Leberhomogenat $\hat{=}$ 50 mg Gewebe wurde in 1.1 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) 10 Min. bei 37°C mit $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]\text{-Testosteron}$ ($5 \cdot 10^{-6} - 10^{-4}$ mol/l) inkubiert.
(Mittelwerte $\pm\sigma$ von Vierfach-Bestimmungen. Wegen der großen Übereinstimmung der Werte waren die Standardabweichungen so geringfügig, daß sie nicht dargestellt werden konnten.)

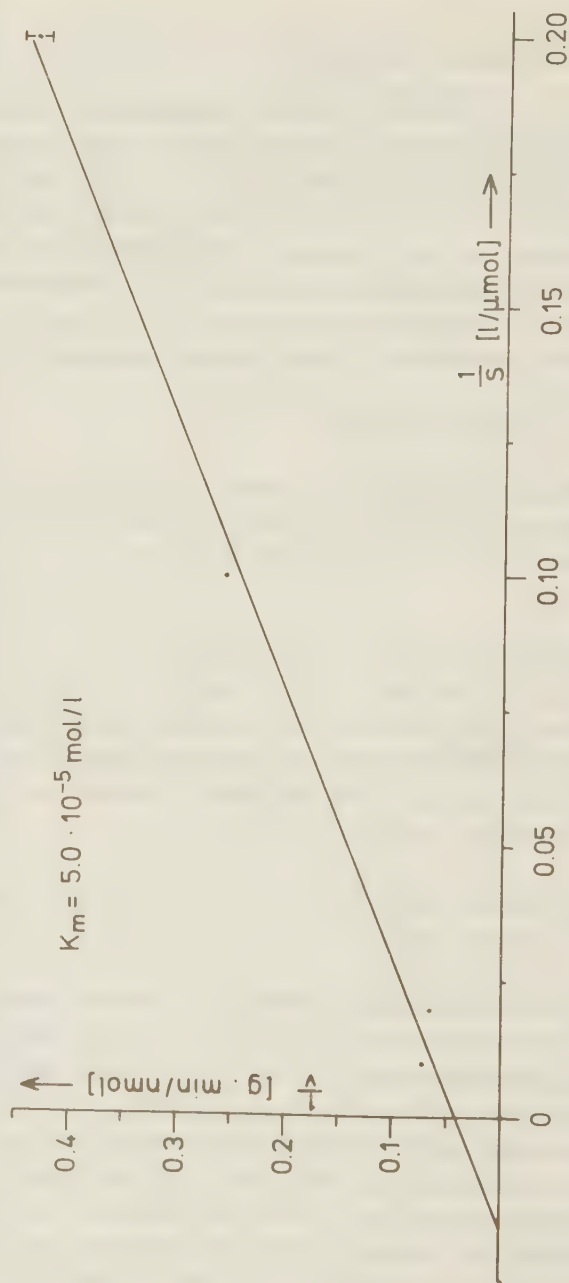
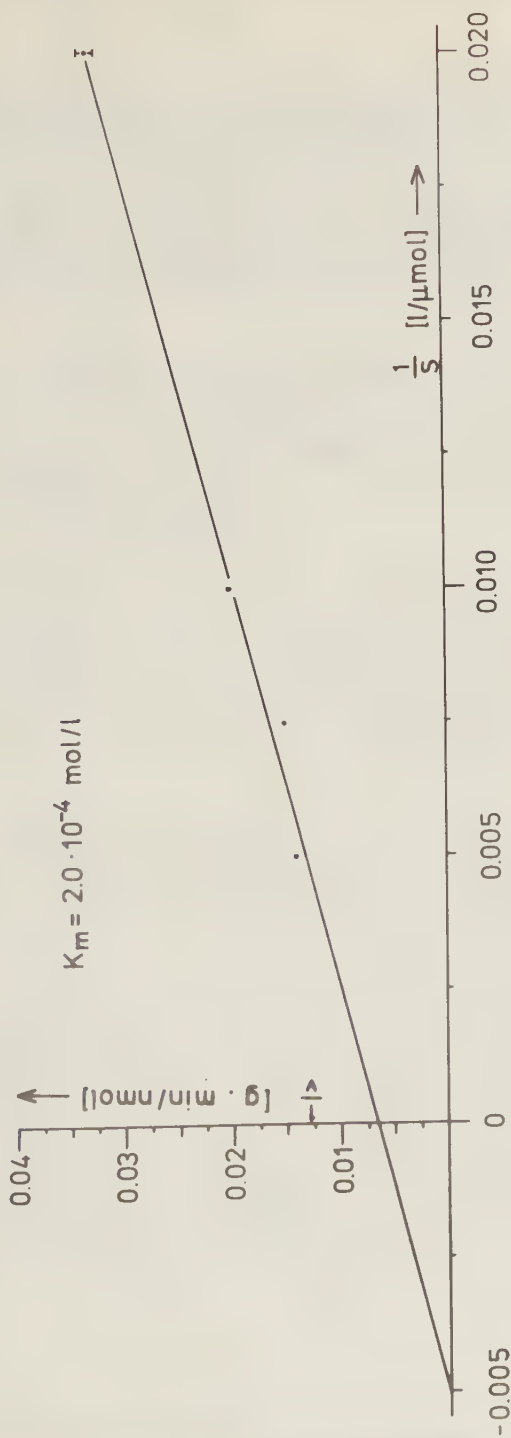


ABB. 3B: K_M -WERT: 2 α -HYDROXYLIERUNG VON 5 α -DHT IN RATTEN ♂

Leberhomogenat $\hat{=}$ 50 mg Gewebe wurde in 1.1 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) bei 37°C 5Min. mit [1 α ,2 α -T]-5 α -DHT ($5 \cdot 10^{-5}$ - $2 \cdot 10^{-4}$ mol/l) inkubiert.

(Mittelwerte $\pm$ σ von Vierfachbestimmungen. Wegen der großen Übereinstimmung der Werte waren die Standardabweichungen so geringfügig, daß sie nicht dargestellt werden konnten.)



TAB. 2: COENZYSPEZIFITÄT DER C-2-HYDROXYLIERUNG VON
TESTOSTERON UND 5 α -DHT

50 mg Leberschnitte ♂ oder die entsprechende Menge Zellfraktion wurden 10 Min. bei 37°C in 1.1 ml Ringer-PO₄ - bzw. TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) mit [1 α ,2 α -T]-Testosteron oder [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron (10⁻⁵ mol/l) unter Zusatz der angegebenen Coenzyme (5 · 10⁻⁴ mol/l) inkubiert.
(Mittelwerte $\pm \sigma$ für n = 4)

*Experiment II: 200 mg Gewebe, 30 Min. Inkubation
100% $\approx$ 0.18 $\pm$ 0.008 nmol/g · min

Gewebeteil	Zusätze	Testosteron		5 α -Dihydrotest.	
		HTO-Bildg. %d.Kontr.	OH-Prod. nmol g · min	HTO-Bildg. %d.Kontr.	OH-Prod. nmol g · min
Schnitte	-	104	2.72 $\pm$ 0.08	128	2.57 $\pm$ 0.09
Mikrosomen (Kontrollwert)	NADPH	100	2.63 $\pm$ 0.01	100	2.02 $\pm$ 0.05
Mikrosomen (Exp. I)	NADH	13	0.34 $\pm$ 0.01	62	1.24 $\pm$ 0.06
Mikrosomen (Exp. II*)	NADH	-	-	70	0.13 $\pm$ 0.004
Mikrosomen	NADP	4	0.11 $\pm$ 0.005	26	0.52 $\pm$ 0.06
Mikrosomen	-	3	0.08 $\pm$ 0.015	6	0.3 $\pm$ 0.07
Cytoplasma	-	1	0.02 $\pm$ 0.002	5	0.09 $\pm$ 0.01

Daß sowohl in der Mikrosomenfraktion ohne Coenzymzusatz als auch im Cytoplasma sich geringfügig Enzymaktivität zeigt, mag an einer unvollständigen Trennung der beiden Fraktionen liegen. Außerdem scheint es nicht möglich zu sein, die Mikrosomen vollkommen coenzymfrei zu isolieren. Selbst nach fünfmaligem Waschen der Mikrosomenfraktion mit Puffer bleibt eine Restaktivität erhalten.

Die beschriebenen Ergebnisse lassen keinen Zweifel daran, daß es sich bei der untersuchten Reaktion um eine Hydroxylierung handelt. In Tabelle 2 wird deshalb außer der prozentualen HTO-Bildung die absolute Menge an gebildetem Hydroxylierungsprodukt in nmol / g Leber . min angegeben.

1.1.5. Identifizierung von 2 α -OH-Testosteron

Wie das vorherige Kapitel zeigt, beruht die Tritium-Abspaltung aus [1 α ,2 α -T]-Testosteron und [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron in der Leber männlicher Ratten auf einer enzymatischen Reaktion. Aufgrund ihrer Beeinflussbarkeit durch verschiedene biochemische Parameter konnte sie als Hydroxylierung klassifiziert werden.

Es stellte sich nun die Aufgabe, das Produkt dieser mit Hilfe der "stoffwechsellaabilen Tritium-Markierung" eindeutig nachgewiesenen enzymatischen Reaktion mit klassisch chemischen Methoden zu identifizieren: außer HTO sollte das entstandene Hydroxy-Steroid nachgewiesen werden.

Wie in Abschnitt Methodik beschrieben wurden aus einem Ansatz, der Lebermikrosomen ♂, NADPH und inaktives Testosteron enthielt, nach der Inkubation die Steroide mit Äther extrahiert. Die Auftrennung erfolgte dünnschichtchromatographisch nach dem in Abbildung 8 aufgezeichneten Schema in den Fließmittelsystemen A und B. Die UV-aktive Substanz mit dem Wert $R_F = 0.26$ im Fließmittel Chloroform/Aceton (9 : 1) wurde massenspektrometrisch und gaschromatographisch untersucht.

ABB. 4: MASSENSPEKTRUM VON 2 α -OH-TESTOSTERON

A: authentische Probe von 2 α -OH-Testosteron

B: nach Inkubation von Testosteron mit Rattenlebermikrosomen δ isoliertes 2 α -OH-Testosteron (Versuchsdurchführung siehe Methodik)

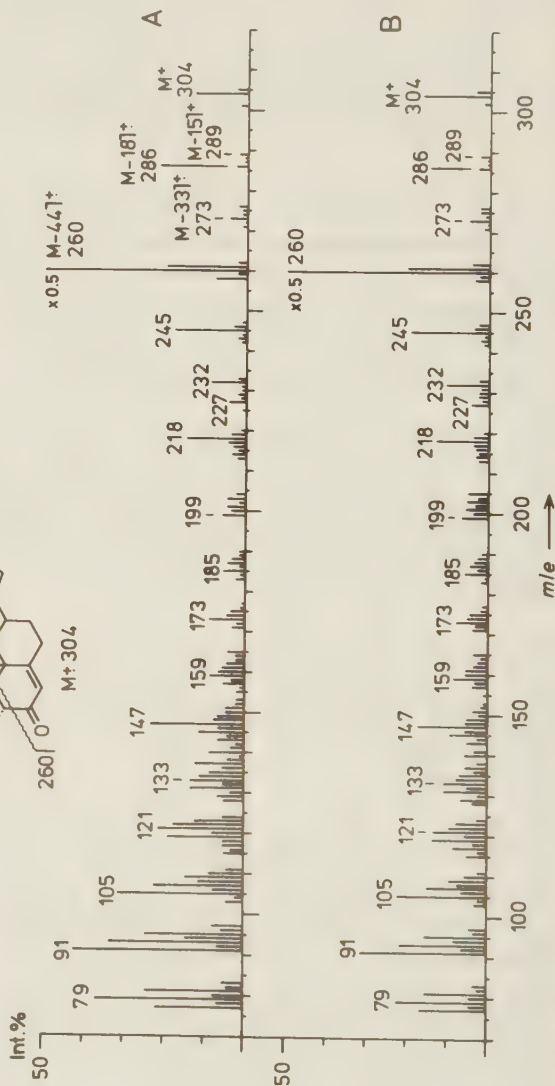
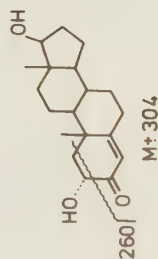
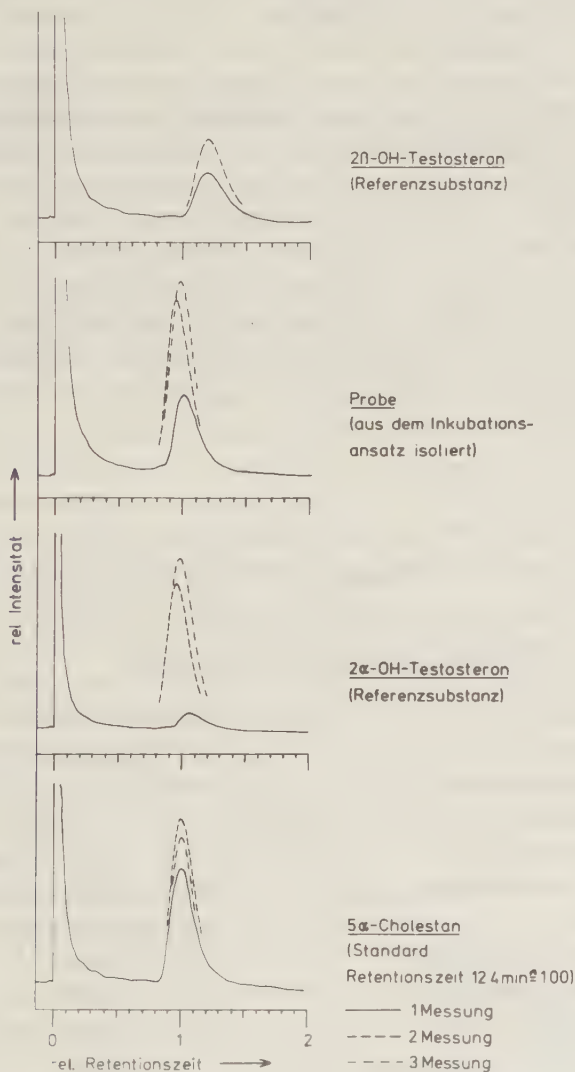


ABB. 5: GASCHROMATOGRAMME DER MO-TMS-DERIVATE VON 2α - u. 2β -OH-T

Isolierung des Steroids, Derivatbildung und Messung: siehe Methodik und Tabelle 4



Das davon gemessene Massenspektrum - dargestellt in Abb. 4 - ist identisch mit dem von authentischem 2α -OH-Testosteron erstellten Spektrum. Da es von der nicht derivatisierten Substanz aufgenommen wurde, ist neben dem Mol-Peak auch die für das Steroid typische Fragmentierung gut zu erkennen.

Für die gaschromatographischen Untersuchungen wurden nach der im Kapitel Methodik angegebenen Vorschrift zuerst die 3-Ketogruppe der isolierten Testosteron-Metaboliten sowie der Referenzsubstanzen 2α - und 2β -OH-Testosteron zum O-Methyloxim umgesetzt und anschließend die OH-Gruppen silyliert. Die Gaschromatogramme der Verbindungen zeigt Abbildung 5, die relativen Retentionszeiten (5α -Cholestan = 1.00) sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Diese Werte stimmen in der Relation überein mit denen, die unter ähnlichen Bedingungen von Lisboa und Plasse (60) ermittelt wurden. Es wird deutlich, daß die aus dem Inkubationsansatz isolierte Substanz identisch ist mit 2α -OH-Testosteron.

TAB. 3: RELATIVE RETENTIONSZEITEN (5α -CHOLESTAN = 1.00) DER METHYLOXIM-TRIMETHYLSILYLÄTHER-DERIVATE VON 2α - UND 2β -OH-TESTOSTERON UND DER PROBE

Durchführung der Derivatbildung und Gaschromatographie:
siehe Methodik
(Mittelwerte aus Dreifach-Messungen)

Substanz	rel. Retentionszeit
5α -Cholestan	1.00
2α -OH-Testosteron	0.97
Probe	0.98
2β -OH-Testosteron	1.20

1.1.6. Parallelität der Resultate mit ^3H - und ^{14}C -markiertem Testosteron

Die Identifizierung von inaktivem $2\alpha\text{-OH-Testosteron}$ beweist, daß labilisiertes Tritium unter anderem ein Indikator für Hydroxylierungsreaktionen ist. Wie bereits erläutert, kann man erwarten, daß das abgespaltene HTO der Menge des gebildeten Hydroxylierungsproduktes äquivalent ist. Z.B. ergibt sich nach Wenzel (82) bei der 2-Hydroxylierung von Östradiol durch Tyrosinase eine Parallelität zwischen HTO-Bildung und $^{14}\text{C-OH-Produkt}$; es tritt also kein Isotopie-Effekt auf. Im folgenden sollte versucht werden, auch für die 2-Hydroxylierung von Testosteron eine Parallelität zwischen HTO-Bildung und $^{14}\text{C-OH-Produkt}$ nachzuweisen.

Das Enzym Tyrosinase war hierbei nicht anwendbar, weil es zwar bei Aromaten, nicht aber bei Testosteron zu einer Hydroxylierung führt. Daher mußte Rattenleber als Enzymquelle eingesetzt werden. Dies war deshalb von Nachteil, weil mit Lebermikrosomen beim Testosteron neben der Hydroxylierung an C-2 eine Vielzahl von enzymatischen Vorgängen möglich ist (44, 46, 50 - 54). Ein vollständiges Erfassen von primär gebildetem $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-2-Hydroxy-Testosteron}$ war somit unwahrscheinlich.

Lebermikrosomen σ^1 wurden mit NADPH und einem Gemisch aus $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]\text{-}$ und $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-Testosteron}$ unter den üblichen Bedingungen inkubiert. Der Versuch wurde ausgewertet, indem

- das gebildete HTO gemessen und daraus die Menge an $2\alpha\text{-OH-Testosteron}$ errechnet wurde
- nach DC-Auftrennung der Metabolite die Menge des entstandenen $[4\text{-}^{14}\text{C}]\text{-2}\alpha\text{-OH-Testosteron}$ bestimmt wurde
- die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotienten von Testosteron und seinen Abbauprodukten vor bzw. nach der Inkubation ermittelt wurden.

Die Radiodünnschichtchromatogramme zur Isolierung des radioaktiven 2α -OH-Testosteron sind zusammen mit den $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotienten der Metabolite in Abbildung 6 dargestellt. Die Ausbeuten an HTO und $[4-^{14}\text{C}]-2\alpha$ -OH-Testosteron werden in Tabelle 5 verglichen. Abbildung 8 gibt eine Übersicht über den Zusammenhang der Isolierung von inaktivem und aktivem Hydroxylierungsprodukt und der HTO-Messung.

Wie Tab. 4 zeigt, tritt bei der Reaktion ein Isotopie-Effekt auf (83): Da Tritium-markiertes Testosteron langsamer hydroxyliert wird als Testosteron, das nur ^1H an C-2 enthält, ist nach der Inkubation im zurückbleibenden Testosteron das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis höher als im primär eingesetzten. Angesichts dieses Ergebnisses müßte man eine - im Vergleich zur Hydroxylierung von ^{14}C -Testosteron - verminderte HTO-Bildung erwarten. Das Gegenteil ist aber gemäß Tabelle 5 der Fall. Es errechnet sich entsprechend der HTO-Bestimmung eine ca. doppelt so große Menge an 2α -OH-Testosteron wie mit dem ^{14}C -markierten Steroid.

TAB. 4: $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -QUOTIENTEN BEI DER C-2-HYDROXYLIERUNG VON
TESTOSTERON

Versuchsdurchführung: siehe Tab. 5
(Mittelwerte $\pm \sigma$ für $n = 4$)

Steroid	Substrat: [$1\alpha, 2\alpha$ -T]- und [$4-^{14}\text{C}$]- Testosteron		Reaktionsprodukt: [1α -T]- und [$4-^{14}\text{C}$]- 2α -OH-Testosteron
	vor der Inkubation	nach der Inkubation	
$\frac{\text{Zpm } ^3\text{H}}{\text{Zpm } ^{14}\text{C}}$	3.86 ± 0.02	4.15 ± 0.02	1.42 ± 0.07

TAB. 5: PARALLELITÄT DER C-2-HYDROXYLIERUNG VON ^3H - UND ^{14}C -MARKIERTEM TESTOSTERON

Eine Mischung aus $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]$ - und $[4\text{-}^{14}\text{C}]$ -Testosteron (10^{-4} mol/l) und NADPH ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) wurde mit Mikrosomen ≈ 75 mg Lebergewebe ♂ in 1.5 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) 10 Min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz geteilt:

- 0.2 ml wurden mit 1.0 ml Puffer verdünnt und das HTO durch Gefrierdestillation bestimmt.
- 1.0 ml wurden mit Chloroform ausgeschüttelt und die extrahierten Steroide durch mehrfache DC in den Fließmitteln A und B getrennt (vergleiche Abb. 6).

SUBSTRAT:	$[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]$ - TESTOSTERON	$[4\text{-}^{14}\text{C}]$ - TESTOSTERON
Reaktionsprodukte:	HTO	$[4\text{-}^{14}\text{C}]$ -2 α -OH-Test.
Ausbeute [% d. eing. A.]	6.13 ± 0.25	$5.8 \pm 0.5^*$
Umsatz $\left[\frac{\text{nmol OH-Produkt}}{\text{min} \cdot \text{g}} \right]$	24.5 ± 1.0 (n = 4)	11.6 ± 1.0 (n = 3)

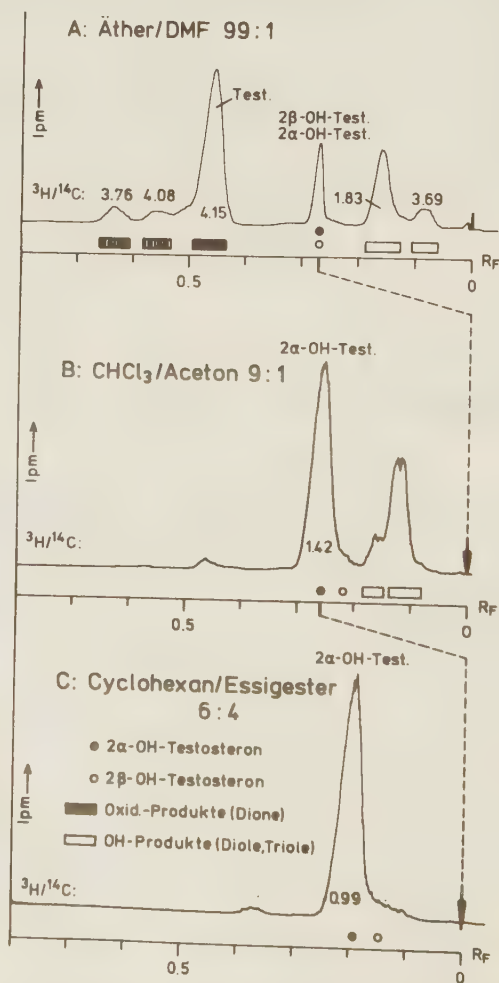
*Der angegebene Wert bezieht sich auf die 1. Rechromatographie und wurde - da die insgesamt wiedergefundene Aktivität nach Aufarbeitung der Ansätze zwischen 76 - 80% betrug - auf 100% Wiederfindung korrigiert.

ABB. 6: RADIODÜNNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE ZUR ISOLIERUNG VON $[^{14}\text{C}]$ -2 α -OH-TESTOSTERON

Inkubationsansatz: siehe Tab. 5

Die Steroide wurden aus dem Ansatz extrahiert, durch DC getrennt, das radioaktive Maximum mit dem R_F -Wert von 2 α -OH-Testosteron abgeschabt, eluiert und rechromatographiert.

Außerdem wurde von den einzelnen Metaboliten der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient bestimmt. $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient des eingesetzten Testosteron: 3.86 (vergleiche Tab. 4).



Die hier gefundene Diskrepanz der Hydroxylierungsrate von Testosteron einerseits bestimmt als HTO und andererseits als [^{14}C]-OH-Produkt kann verschiedene Ursachen haben:

1. Eine Abspaltung des Tritium nicht nur aus Testosteron selbst, sondern auch aus Folgeprodukten (z.B. 5 α -Dihydrotestosteron, Androstandiole).
2. Eine mangelhafte stereospezifische Tritium -Markierung des Substrats. Das verwendete [1 α ,2 α -T]-Testosteron enthält nur 84% Tritium in den angegebenen Positionen, die übrigen 16% verteilen sich auf die 1 β - bzw. 2 β -Position (84). Da für Testosteron eine 2 β -Hydroxylase bekannt ist, mußte mit einer entsprechenden HTO-Bildung gerechnet werden. Dafür spricht auch, daß der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient des entstandenen 2 α -OH-Testosteron um mehr als die Hälfte abnimmt (Abb. 6).
3. Keine vollständige Erfassung des [4- ^{14}C]-2 α -OH-Testosteron infolge weiterer Metabolisierung oder Konjugatbildung.
4. Eine sekundäre HTO-Abspaltung aus primär gebildetem [1 α -T]-2 α -OH-Testosteron.

Betrachtet man die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotienten der einzelnen Testosteron-Metaboliten (Abb. 6), so läßt sich zu Punkt 1 folgendes aussagen:

Außer 2 α -OH-Testosteron entsteht noch ein weiteres polares Abbau-Produkt ($R_F = 0.17$), bei dem der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient (= 1.83) im Vergleich zu Testosteron gesunken ist. Bei diesem Metabolit könnte es sich z.B. um 2 α -OH-5 α -Dihydrotestosteron handeln. Im übrigen ist in keinem der untersuchten Metabolite nur ^{14}C enthalten. Dies bedeutet, daß eine gleichzeitige Labilisierung von Tritium an C-1 und C-2 nicht stattfindet und eine mögliche enzymatische Dehydrierung in Rattenleber mit Recht auszuschließen ist (vergleiche S. 11).

Eine HTO-Bildung durch Metabolisierung von [1 α -T- ^{14}C]-2 α -OH-Testosteron (Punkt 4) findet nicht statt. Zwar wird dieses Produkt gemäß

ABB. 7: METABOLISIERUNG VON 2 α -OH-TESTOSTERON

Eine Mischung aus [1 α -T]- und [4- 14 C]-2 α -OH-Testosteron (insgesamt $0.7 \cdot 10^{-5}$ mol/l, $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient: 0.99) und NADPH ($5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) wurde mit Mikrosomen ≈ 50 mg Lebergewebe ♂ in 1.0 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) 10 Min. bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Steroide mit Chloroform extrahiert, in Chloroform/Aceton (9 : 1) dünn-schichtchromatographisch getrennt und die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotienten der Metabolite bestimmt.

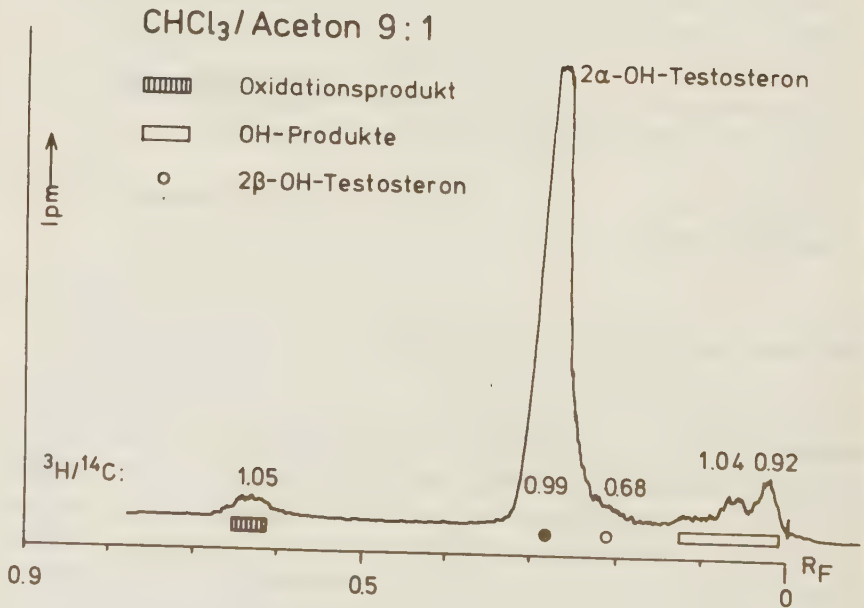


ABB. 8: SCHEMA ZUR ISOLIERUNG VON 2α -OH-TESTOSTERON

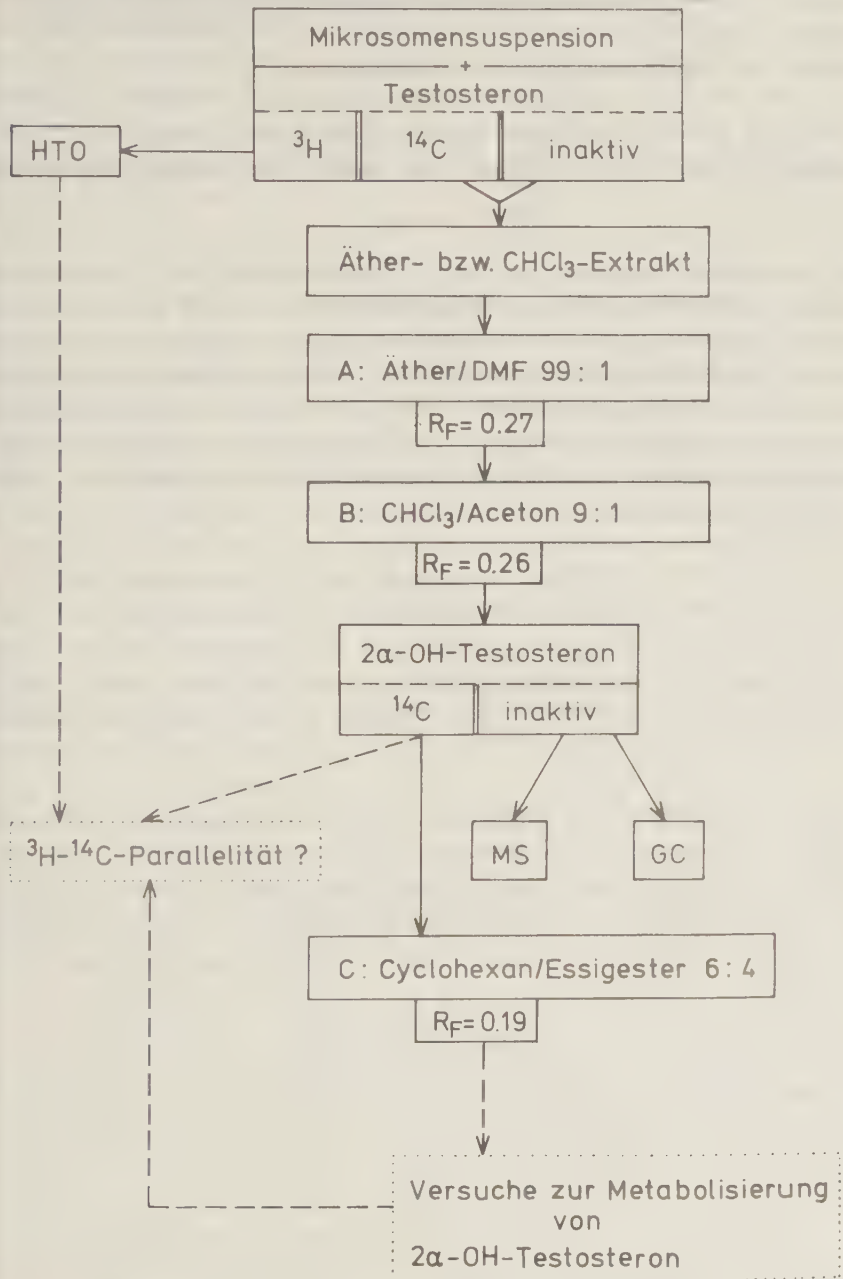


Abb. 7 durch Lebermikrosomen zu mindestens drei Metaboliten umgewandelt (etwa 15%), eine Tritium-Abspaltung ist aber nicht nachweisbar: Der $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient hat sich bei den Metaboliten im Vergleich zum Ausgangsprodukt nicht geändert.

Als Grund für die überhöhte HTO-Bildung nehmen wir demnach die Punkte 1 - 3 an, während die unter Punkt 4 aufgeführte Reaktion als Ursache nicht in Frage kommt.

Aus diesen Überlegungen läßt sich in Zusammenhang mit den Versuchsergebnissen folgende Schlußfolgerung ziehen: Durch die HTO-Bildung werden grundsätzlich alle Hydroxylierungsreaktionen angezeigt, die an dem Tritium-markierten C-Atom des ursprünglichen sowie des metabolisierten Steroids stattfinden. Dies ermöglicht das Messen von Hydroxylierungsraten auch dort, wo das hydroxylierte Produkt in Folgereaktionen weiter umgewandelt wird und nicht mehr als solches isoliert werden kann.

1.2. Die HTO-Bildung aus [5 α -T]-Dihydrotestosteron - eine Hydroxylierung oder Dehydrierung?

Da sich die HTO-Bildung aus Tritium-markierten Substraten als zuverlässiger Indikator für enzymatische Reaktionen erwiesen hat, soll mit Hilfe dieser Methode ein schon früher bearbeitetes Problem nochmals aufgegriffen werden: die mögliche Metabolisierung von 5 α -Dihydrotestosteron an C-5.

Wenzel und Pitzel (85) wiesen bei Ratten in vivo und in vitro eine beträchtliche Tritium- Abspaltung aus [4,5,6-T]-5 α -Androstandion nach, die zunächst auf eine Hydroxylierung ausschließlich in Position 4 zurückgeführt wurde. Nachfolgende Experimente mit [5,6-T]-5 α -Androstandion ergaben, daß es darüberhinaus zu einer Labilisierung von Tritium in 5- oder 6-Stellung kommen mußte. Als Ursache für diese Ergebnisse wurden Hydroxylierungsreaktionen an den markierten C-Atomen oder eine Wiedereinführung der Δ 4-Doppelbindung diskutiert. Die Tatsache, daß sich bei anaerober Inkubation von [4,5,6-T]-Androstandion mit männlicher Niere und Testis in Gegenwart von 1,2-Naphthochinon eine erheblich erhöhte HTO-Bildung ergab, und daß - ebenfalls in der Niere - die Tritium-Abspaltung aus [5,6-T]-Androstandion durch Sauerstoffmangel nicht nennenswert hemmbar war (85 / Abb. 4), machte eine Dehydrierung von 5 α -Dihydrotestosteron wahrscheinlich.

Endgültig konnte diese Frage jedoch nicht geklärt werden, da eine Unsicherheit über die Verteilung des Tritium im Steroid-Molekül bestand (86 - 88). Nachdem es uns gelang, spezifisch am C-5 mit Tritium markiertes 5 α -Dihydrotestosteron herzustellen, wurden die Probleme im Rahmen dieser Arbeit erneut aufgegriffen.

Wir suchten Antwort auf die Frage:

Wird aus [5 α -T]-Dihydrotestosteron enzymatisch Tritium abgespalten?

1.2.1. Versuche zur Charakterisierung einer enzymatischen Reaktion in Rattenorganen

Organschnitte männlicher Ratten wurden mit [5 α -T]-Dihydrotestosteron inkubiert und anschließend der Ansatz auf HTO geprüft. Tatsächlich war eine Tritium-Abspaltung nachweisbar: von der eingesetzten Aktivität konnten ca. 0.5 - 1% als HTO isoliert werden.

Es wurde zunächst sicher gestellt, daß es sich um eine enzymatische Reaktion und nicht um eine Verunreinigung durch HTO oder um die chemische Labilisierung des Tritium handelte:

1. Kontrollversuche, in denen das Steroid in Puffer allein oder unter Zusatz von denaturiertem Gewebe inkubiert wurde, ergaben keine oder nur eine geringfügige HTO-Bildung. Die Meßraten für HTO lagen bei 4 000 - 5 000 Ipm/ml Puffer, die Kontrollwerte dagegen bei 50 - 150 Ipm/ml.
2. Eine eindeutige Abhängigkeit der HTO-Bildung von der Gewebemenge in Leber, Niere und Prostata sowie von der Inkubationszeit in der Niere ist aus den Abb. 9 und 10 zu ersehen. Es fällt auf, daß in Leberschnitten im Gegensatz zu den anderen Organen schon ab 20 mg Gewebe die HTO-Bildung nicht weiter ansteigt. Wahrscheinlich wird hier [5 α -T]-Dihydrotestosteron so schnell metabolisiert, daß für die Meßreaktion rasch Substratmangel eintritt.
3. Für Leber, Niere (Abb. 11a) und Prostata (Abb. 11b) wurden die in Tab. 6 aufgeführten K_m -Werte bestimmt und Michaelis-Konstanten für die 5 α -Reduktase gegenübergestellt (21).

ABB. 9: TRITIUM-ABSPALTUNG AUS [5 α -T]-DHT IN DER NIERE ♂ -
F(INKUBATIONSZEIT)

100 mg Nierenschnitte ♂ wurden in 1.5 ml Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) bei 37.5°C 2 - 60 Min. mit [5 α -T]-DHT ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l $\hat{=}$ 1.64 μ Ci) inkubiert (n = 4).

Der Blindwert (Puffer + [5 α -T]-DHT ohne Gewebe, 37°C, 30 Min.) betrug 861 ± 70 Zpm HTO und wurde bei den Werten der Abbildung berücksichtigt.

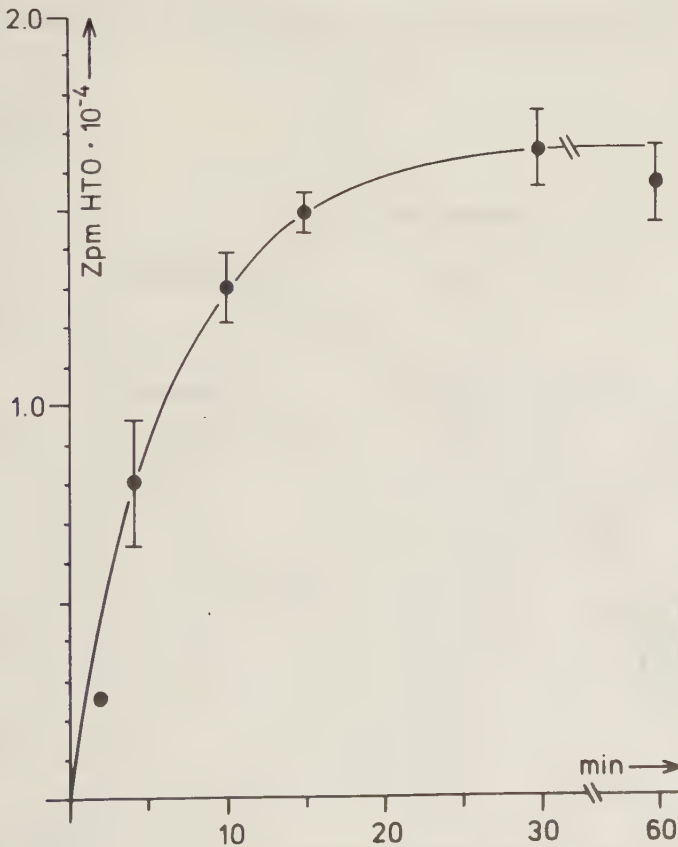


ABB. 10: HTO-BILDUNG AUS $[5\alpha\text{-T}]\text{-DHT}$ IN RATTEN $\sigma^{\uparrow}$ - F(GEWEBEMENGE)

10 - 80 mg Gewebeschnitte von Leber, Niere und Prostata wurden in 1.5 ml Ringer- PO_4 -Puffer (pH 7.4) bei 37.5°C mit $[5\alpha\text{-T}]\text{-DHT}$ ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l $\hat{=}$ $0.93 \mu\text{Ci}$) inkubiert.

Blindwert: 40 mg Prostata- bzw. Nierenschnitte wurden im Wasserbad bei 70°C 20 Min. denaturiert und anschließend mit $[5\alpha\text{-T}]\text{-DHT}$ wie oben inkubiert ($n = 3$).

HTO-Bildung: Prostata: 179 ± 9.3 Zpm HTO

Niere: 262 ± 8.6 Zpm HTO

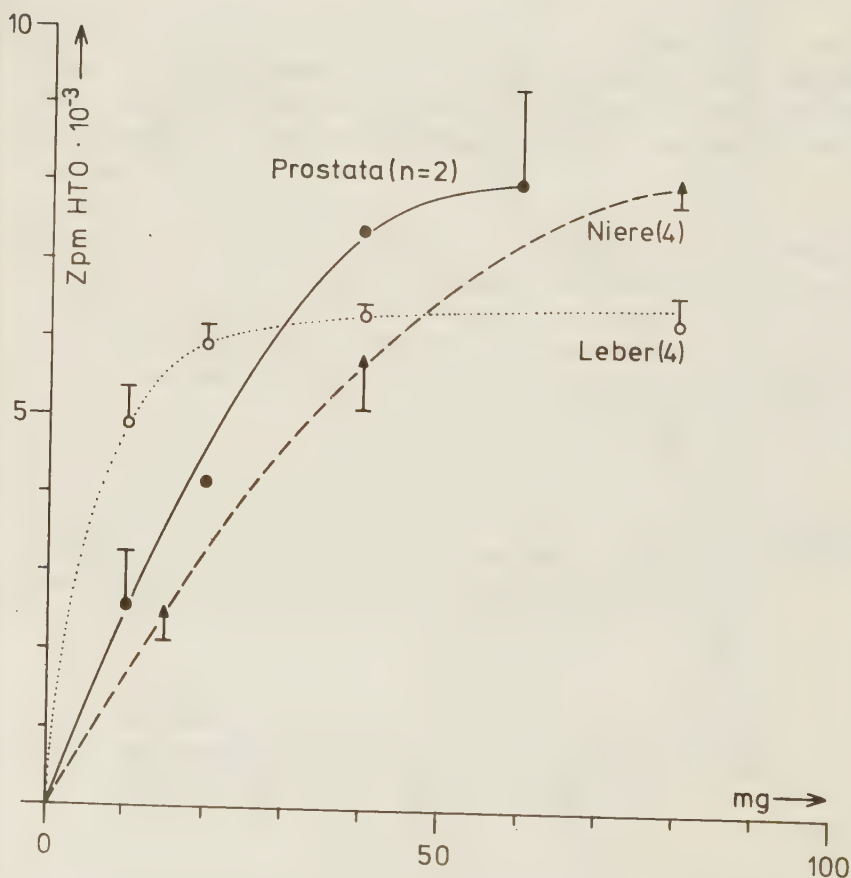


ABB. 11A: K_M -WERT: DEHYDRIERUNG VON 5α -DHT IN RATTEN-NIERE ♂

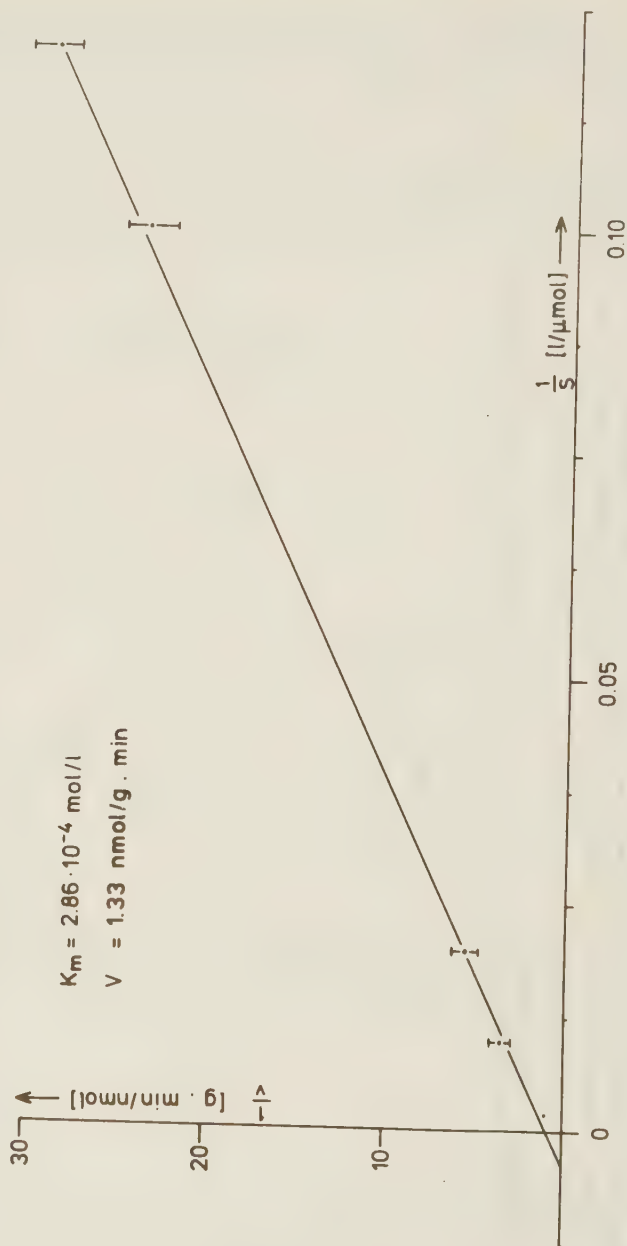
100 mg Nierenschnitte ♂ wurden in 1.6 ml Krebs-Ringer- PO_4 -Puffer (pH 7.4) 30 Min. bei 37.5°C mit $[5\alpha\text{-T}]\text{-DHT}$ ($5 \cdot 10^{-4} - 7.1 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$) inkubiert ($n = 4$).

blindwert: vergleiche Abb. 10



ABB. 11B: K_M -WERT: DEHYDRIERUNG VON 5 α -DHT IN RATTEN-PROSTATA

100 mg Prostata-Schnitte wurden in 1.6 ml Krebs-Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) 30 Minuten bei 37.5°C mit [5 α -T]-DHT [5 · 10⁻⁴ ~ 8.3 · 10⁻⁶ mol/l] inkubiert (n=4).
Blindwert: vergleiche Abb. 10



TAB. 6: ABHÄNGIGKEIT DER HTO-ABSPALTUNG AUS [5 α -T]-DHT
VON DER SUBSTRATKONZENTRATION IN RATTENORGANEN ♂

100 mg Gewebeschnitte ♂ wurden in 1.6 ml Krebs-Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) 30 Min. bei 37°C mit [5 α -T]-Dihydrotestosteron ($5 \cdot 10^{-4}$ - $8 \cdot 10^{-6}$ mol/l) inkubiert.

Organ	Dehydrierung ?		5 α -Hydrierung (21) (5 α -Reduktase)
	$v \left[\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}} \right]$	K_m [mol/l] (Gewebeschnitte)	K_m [mol/l] (Mikrosomen)
Leber	0.18	$1.1 \cdot 10^{-4}$	$1.54 \cdot 10^{-4}$
Niere	0.17	$0.6 \cdot 10^{-4}$	-
Prostata	1.33	$2.9 \cdot 10^{-4}$	$0.9 \cdot 10^{-6}$

Nachdem durch diese Ergebnisse experimentell gesichert war, daß die HTO-Bildung Folge einer enzymatischen Reaktion ist, wurde die in Tab. 7 dargestellte Organ- und Sexualspezifität der Reaktion ermittelt. In männlicher Niere, Leber und Prostata sowie in weiblicher Leber trat der Abbau in dem gleichen Maß auf (ca. $5 \cdot 10^{-2}$ nmol/g . min). Nur halb soviel HTO oder weniger wurde in Testis, Samenblase, weiblicher Niere und Ovar gebildet. Durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit 5 α -Dihydrotestosteron ließ sich die Reaktion in männlichen Tieren nur wenig, in weiblichen dagegen auf das Doppelte bis Dreifache erhöhen (Werte nicht dargestellt, da keine Signifikanz nachweisbar).

TAB. 7: HTO-BILDUNG AUS [5 α -T]-DIHYDROTESTOSTERON IN ORGAN-
SCHNITTEN VON RATTEN ♂ UND ♀

100 mg Gewebeschnitte wurden in 1.5 ml Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (pH 7.4) mit [5 α -T]-Dihydrotestosteron ($2 \cdot 10^{-5}$ mol/l) 30 Min. inkubiert.

(Mittelwerte $\pm \sigma$ für n = Anzahl der Bestimmungen)

Blindwert: siehe Tab. 8

Organ	♂			♀		
	n	HTO	Testosteron	n	HTO	Testosteron
		%d.eing. Akt.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$		%d.eing. Akt.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$
Leber	19	0.52 ± 0.081	$5.2 \cdot 10^{-2}$	8	0.62 ± 0.050	$6.2 \cdot 10^{-2}$
Niere	14	0.49 ± 0.043	$4.9 \cdot 10^{-2}$	3	0.31 ± 0.044	$3.1 \cdot 10^{-2}$
Ovar		-	-	3	0.22 ± 0.12	$2.2 \cdot 10^{-2}$
Prostata	13	0.51 ± 0.078	$5.1 \cdot 10^{-2}$		-	-
Testis	8	0.20 ± 0.032	$2.0 \cdot 10^{-2}$		-	-
Samen- blase	3	0.069 ± 0.025	$0.7 \cdot 10^{-2}$		-	-

1.2.1. Zellfraktionierung und Coenzyspezifität

Zur Klärung, ob es sich bei der beobachteten Reaktion um eine Dehydrierung oder Hydroxylierung handelt, testeten wir den Einfluß der üblichen Hydroxylasen-Inhibitoren und versuchten gleichzeitig die enzymatische Reaktion in der Niere zu charakterisieren.

Die Versuchsergebnisse waren wie folgt:

1. Die HTO-Bildung scheint nicht auf einer Hydroxylierung zu beruhen, da sie unabhängig von Sauerstoff-Zufuhr oder -Mangel ist. Sie wird auch durch Hydroxylase-Inhibitoren für Steroid-Hydroxylasen wie Metopiron (89 -92) und Cyproteronacetat (93 - 94) sowie durch KCN nicht gehemmt. Eine Vorbehandlung der Tiere mit Barbiturat (Induktion von Hydroxylasen (95)) führt nicht zur erhöhten HTO-Bildung in der Leber.
2. Gegen die Wirkung von Hydroxylasen spricht auch die Verteilung der enzymatischen Aktivität in verschiedenen Zellfraktionen. Im Nierengewebe tritt die höchste HTO-Bildung nicht wie für Hydroxylasen bekannt in den Mikrosomen, sondern im Cytoplasma auf. Ein Aktivitätsoptimum der Tritium-Abspaltung liegt im alkalischen Bereich bei $\text{pH} = 8.6$ (Tab. 8).
3. Als der wichtigste Befund gemäß Tab. 8 erscheint uns die Abhängigkeit der Reaktion von Pyridin-Nucleotiden. Auffälligerweise ist die HTO-Bildung bei Zusatz von oxidierten Pyridin-Nucleotiden (NAD bzw. NADP) stärker als mit NADH bzw. NADPH. Diese Resultate sprechen für eine Tritium-Labilisierung aus [5 α -T]-Dihydrotestosteron durch eine 4,5-Dehydrierung und gegen eine Hydroxylierung. Den Ansätzen zugegebenes NADH bzw. NADPH wird durch Nebenreaktionen relativ schnell oxidiert. Dies erklärt, warum auch die reduzierten Coenzyme eine deutliche Wirkung besitzen.

TAB. 8: COENZYMSPEZIFITÄT DER HTO-BILDUNG AUS [5 α -T]-DHT
IN DER NIERE ♂

Cytoplasma oder Mikrosomen = 400 mg Nierengewebe wurden 30 Min. bei 37°C in 1.6 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4 bzw. 8.6) mit [5 α -T]-Dihydrotestosteron und den angegebenen Zusätzen inkubiert (n = 4).

Steroid-Konzentration: $2.5 \cdot 10^{-5}$ mol/l

Coenzym-Konzentration: 10^{-3} mol/l

Bei den Blindwerten (Steroid + Puffer ohne bzw. mit denaturiertem Gewebe) lag der HTO-Gehalt zwischen 50 - 100 Ipm/ml gegenüber 4 000 - 5 000 Ipm/ml bei den übrigen Proben. Diese Blindwerte sind bei den Werten der Tabelle berücksichtigt.

Zellfraktionen	Zusätze	pH	HTO[%d.e.Akt]	Faktor
Mikrosomen	-	7.4	0.013 $\pm$ 0.003	0.01
Mikrosomen	NADP	7.4	0.032 $\pm$ 0.002	0.03
Mikrosomen	NADPH	7.4	0.067 $\pm$ 0.006	0.07
Mikrosomen	NADPH	8.6	0.019 $\pm$ 0.002	0.02
Mikrosomen	NADH	8.6	0.025 $\pm$ 0.003	0.03
Mikrosomen	-	8.6	0.008 $\pm$ 0.0006	0.01
Cytoplasma	NADPH	7.4	0.246 $\pm$ 0.06	0.25
Cytoplasma	NADPH	7.4	0.226 $\pm$ 0.02	0.23
Cytoplasma	-	7.4	0.01 $\pm$ 0.003	0.01
Cytoplasma	-	8.6	0.07 $\pm$ 0.01	0.07
Cytoplasma	NADPH	8.6	0.49 $\pm$ 0.04	0.49
Cytoplasma	NADH	8.6	0.43 $\pm$ 0.02	0.43
Cytoplasma	NADP	8.6	1.00 $\pm$ 0.01	1.00
Cytoplasma	NAD	8.6	0.96 $\pm$ 0.009	1.00
Cytoplasma	FAD	8.6	0.04 $\pm$ 0.004	0.04

Die fehlende Effektivität von FAD als Coenzym ist dazu kein Widerspruch, da das Coenzym für die 5 α -Reduktase NADPH ist.

Das Ausmaß der Dehydrierung reicht aber nicht, um die in der anfangs zitierten Veröffentlichung angegebenen Werte für die HTO-Bildung aus [5,6-T]-5 α -Androstandion zu erklären (85 / Abb. 3). Diese Ergebnisse sind wahrscheinlich auf eine Hydroxylierung am C-6 zurückzuführen. (6-Hydroxylasen sind beschrieben für Testosteron (96) und 5 α -Androstandiol (48)). Dafür sprechen die Inhibition der Tritium-Abspaltung durch Sauerstoffmangel sowie die *in vivo* Befunde.

Unbeantwortet bleibt die Frage nach Reaktionsmechanismus und Aufbau des Dehydrogenase-Systems. In diesem Zusammenhang sind die Erkenntnisse von Golf, Graef und Staudinger (97) über die Struktur der 5 α -Reduktase von Interesse. Danach ist in weiblichen Rattenlebermikrosomen die Rückreaktion 5 α -Dihydrotestosteron $\longrightarrow$ Testosteron möglich, aber nur in Gegenwart von Coenzym Q₁₀. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen können andere Chinone wie z.B. 1,4-Naphthochinon als Elektronenakzeptoren nicht fungieren. Es bleibt zu prüfen, ob sich bei Zugabe von Coenzym Q₁₀ als Elektronenakzeptor mit unserer Methode eine Steigerung der Dehydrierung nachweisen läßt. Für diesen Fall müßte eine biologische Bedeutung neu diskutiert werden.

Es ist außerdem - im Gegensatz zu den Befunden von Golf und Mitarbeitern (97) - nicht sicher, ob die von uns gemessene Reaktion tatsächlich eine von der 5 α -Reduktase katalysierte Rückreaktion ist. Es wäre auch die Wirkung einer unspezifischen Dehydrogenase denkbar. Dafür spricht insbesondere die Tatsache, daß die Enzymaktivität ausschließlich in der Cytoplasmafraktion des Nierengewebes vorkommt, im Endoplasmatischen Reticulum aber, wo normalerweise die 5 α -Reduktase auftritt, nicht nachweisbar ist. Auch die Abhängigkeit der Reaktion von NADH läßt an einer Rückreaktion zweifeln, da das Co-substrat der 5 α -Reduktase ausschließlich NADPH ist.

2. BIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER 2 α -HYDROXYLIERUNG IN RATTEN UND MEERSCHWEINCHEN - IN VIVO UND IN VITRO VERSUCHE

2.1. Sexualspezifität in vivo

Die Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron ist bisher überwiegend durch Inkubation von Organschnitten oder Zellfraktionen bestimmt worden, während Aussagen über die Hydroxylase-Aktivität in vivo - vermutlich wegen der aufwendigen Methodik - wenig oder wie z.B. für die 2 α -Hydroxylase gar nicht bekannt sind.

Auch die Untersuchungen über die sexuelle Differenzierung der Enzymmuster wurden in vitro vorgenommen. Leybold und Staudinger (47) vermuteten als erste beim Abbau von Testosteron geschlechtsspezifische Unterschiede. Nur bei männlichen Ratten fanden sie nämlich nach Inkubation mit Lebermikrosomen polare Metabolite, die später als 6 β -OH-Derivate identifiziert werden konnten (96). Ähnliche Sexualcharakteristika stellten Albaum und Staib (48) für die Hydroxylierung von Androstandion und Conney und Mitarbeiter (98) für den Abbau von Testosteron fest. Schriefers, Cremer und Otto (46) machten dann später - auf diesen Ergebnissen aufbauend - durch systematische Experimente an der intakten Leberzelle deutlich, daß in männlichen Tieren der oxidative, in weiblichen Tieren dagegen der reduktive Stoffwechsel von Testosteron besonders ausgeprägt ist.

Während es über den Testosteron-Stoffwechsel in Ratten zahlreiche Untersuchungen gibt, sind diesbezügliche Angaben für Meerschweinchen sehr spärlich. Es ist lediglich bekannt, daß das Muster der im Urin ausgeschiedenen Steroid-Metabolite von demjenigen anderer Tierarten sehr differiert (99) und daß im Gegensatz insbesondere zu Ratten die 5 α -Reduktase nicht in der Leber, sondern fast ausschließlich in der Nebenniere zu finden ist (18). Außerdem weisen Demisch und Staib (57) in der isoliert perfundierten Meerschweinchen-Leber die Bildung von 7 α - und 6 β -OH-Testosteron nach und vermuten Hydroxylierungsprodukte von 5 α -Dihydrotestosteron. Diese Hydroxylierungsreaktionen sind im Gegensatz zu Ratten als nicht sexualcharakteristisch beschrieben. Eine 2 α -Hydroxylase ist für Cortisol in der Nebenniere von Meerschweinchen bekannt (100).

In diesem Zusammenhang erschien uns die Bearbeitung folgender Fragen von Interesse:

1. Welches Ausmaß hat die 2 α -Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron im Gesamtorganismus von Ratten und Meerschweinchen?
2. Ist die 2 α -Hydroxylierung geschlechtsspezifisch?

Um über den Hydroxylierungsgrad im lebenden Tier etwas aussagen zu können, wurde bisher die folgende Methode angewandt: Bestimmte Zeit nach der Injektion des radioaktiv markierten Steroids wird das Tier getötet und die Metabolite aus den entnommenen Organen isoliert. Dieses Verfahren ist ebenso wie die Bestimmung der hydroxylierten Produkte im Kot und Harn mühsam und unzulänglich besonders dann, wenn die Primär-Metabolite nur teilweise oder gar nicht ausgeschieden werden.

Wenzel und Mitarbeiter entwickelten eine elegante Methode, das Ausmaß der Hydroxylierung in vivo zu messen. Dieses "Radiospirometrie" genannte Verfahren beruht auf dem Prinzip der "stoffwechsel-labilen Tritium-Markierung" (75). Nach der Injektion des radioaktiv markierten Steroids wird das durch Hydroxylierung abgespaltene Tritium homogen im Körperwasser verteilt. Es kann als HTO im Atemwasser bestimmt werden und ist ein Maß für die "Mindest"-Hydroxylierung (76).

In vivo Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in Ratten

In Abbildung 12 ist die durch Radiospirometrie ermittelte in vivo Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in männlichen und weiblichen Ratten in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Berücksichtigt man bei der Berechnung der Hydroxylierungsrate, daß nur ein Tritium-Atom aus [1 α ,2 α -T]-Testosteron bzw. -5 α -Dihydrotestosteron entfernt wird (d.h. % HTO x 2), so ergeben sich folgende Werte: In männlichen Ratten ist 8 Stunden nach der Steroid-Injektion Testosteron zu 64% und 5 α -Dihydrotestosteron zu 84% an

ABB. 12: 2 α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON UND 5 α -DHT IN VIVO
IN RATTEN ♂ UND ♀ (RADIOSPIROMETRIE)

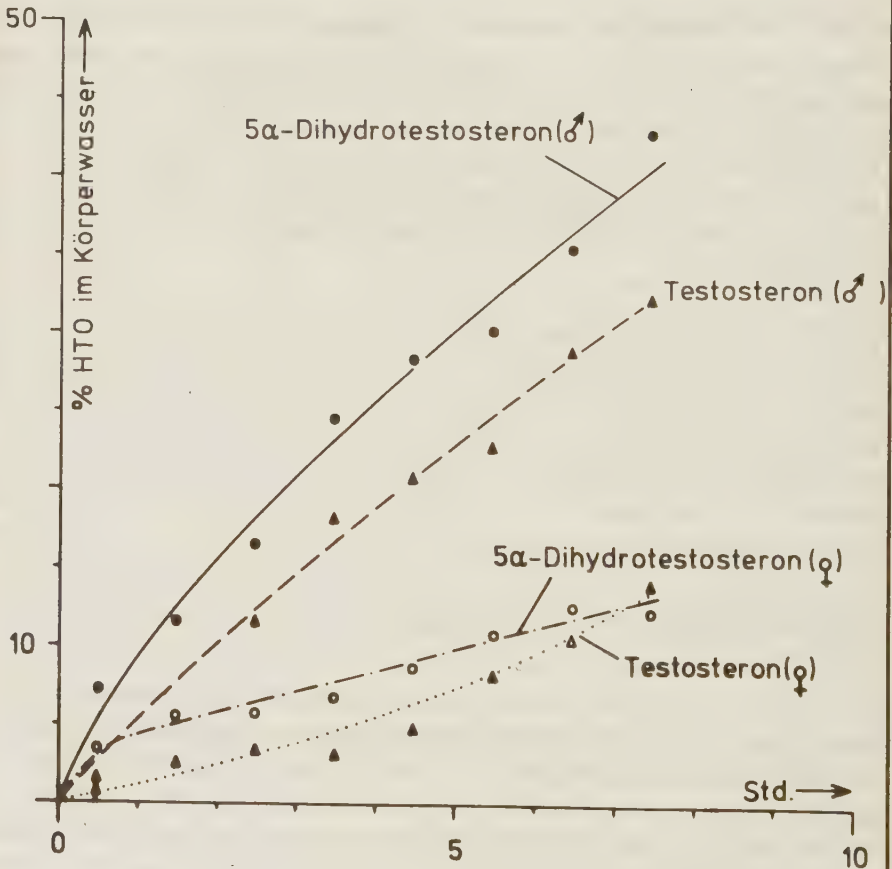
i.p. Injektion der Steroide pro Tier:

[1 α ,2 α -T]-Testosteron: ♂ und ♀ 6.0 μ Ci ($\cong$ 12.0 γ /kg)

[1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron: ♂ 4.8 μ Ci ($\cong$ 12.6 γ /kg)

♀ 4.8 μ Ci ($\cong$ 13.9 γ /kg)

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser



C-2 hydroxyliert. In weiblichen Tieren dagegen werden in der gleichen Zeitdauer bei Testosteron weniger als die Hälfte und bei 5 α -Dihydrotestosteron sogar nur ein Drittel dieser Werte erreicht.

In vivo Hydroxylierung von 5 α -Dihydrotestosteron in Meerschweinchen

Die Verstoffwechselung von 5 α -Dihydrotestosteron in Meerschweinchen ist im Verlauf und Ausmaß von der in Ratten sehr verschieden.

Gemäß Abbildung 13 beträgt bei weiblichen Meerschweinchen nach 10 Stunden die Hydroxylierungsrate nur 8 % und ist damit - bei etwa gleicher Dosis injiziertem Steroid/kg - niedriger als in Ratten.

Bei den männlichen Tieren ergibt sich - ebenfalls dargestellt in Abb. 13 - ein erstaunliches Phänomen: Die im Atemwasser gemessene HTO-Konzentration (Zpm/ml) ist weit höher, als man - selbst bei maximalem Umsatz - erwarten kann. Sie beträgt 3 Std. nach Injektion des Steroidsetwa 300 % der im Tier vorhandenen Tritium-Konzentration (Zpm [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron/ml Körperwasser), die sich unter Berücksichtigung des Verteilungsraums (Körperwasserpool) aus der injizierten Aktivitätsmenge errechnet. Da dies ein Ergebnis von zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ist, muß es eine plausible Erklärung dafür geben.

Zunächst wurde durch zusätzliche Untersuchungen sichergestellt, daß die ausgeatmete Aktivität nur von dem injizierten Steroid stammen konnte: Wurde den Tieren keine Aktivität injiziert, so ließen sich im Atemwasser 8 Stunden danach nur Nullwerte messen.

Demnach läßt sich das Ergebnis am ehesten dadurch erklären, daß die Voraussetzungen für den sonst üblichen Berechnungsmodus (HTO/ml Atemwasser bezogen auf die injizierte Aktivität/ml Körperwasser) nicht gegeben sind. Zum Beispiel sind von dem üblichen Ablauf der HTO-Bildung folgende Abweichungen denkbar:

1. Mit dem Urin ausgeschiedenes Steroid wird bakteriell zersetzt, wobei ebenfalls HTO entsteht. Dies ist unwahrscheinlich, da der

ABB. 13: 2 α -HYDROXYLIERUNG IN VIVO VON 5 α -DHT IN MEERSCHWEIN-
CHEN ♂ UND ♀ (RADIOSPIOMETRIE)

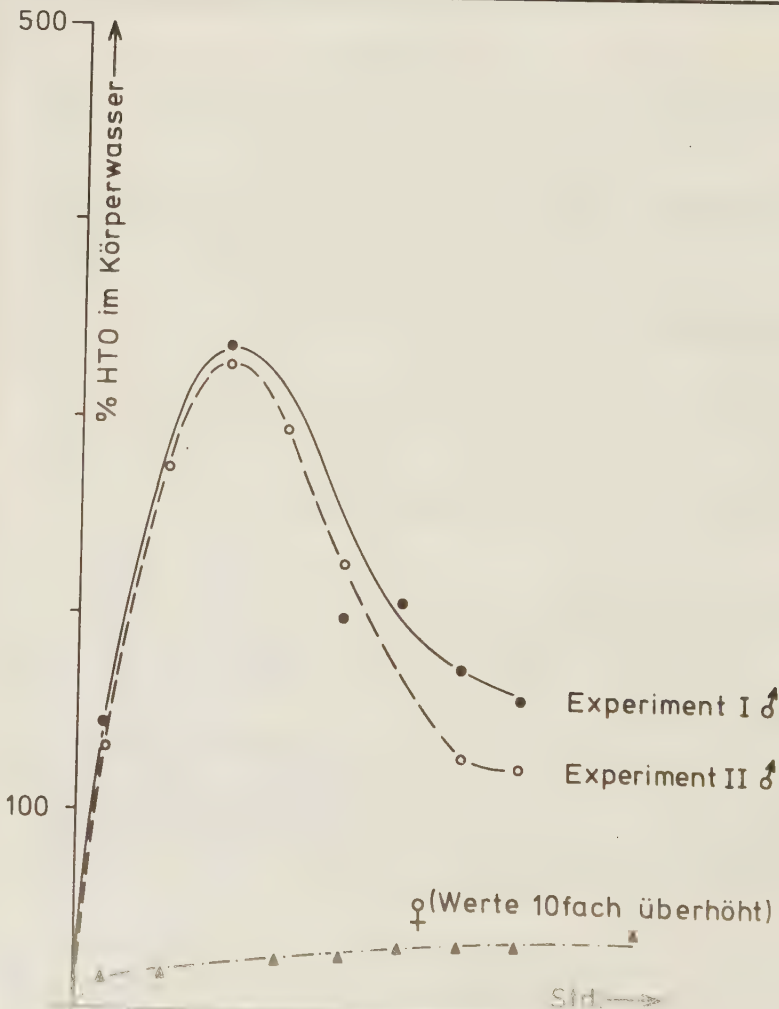
i.p. Injektion von [1 α ,2 α -T]-5 α -DHT pro Tier:

Experiment I: ♂ 9.3 μ Ci ($\hat{=}$ 7.2 γ /kg)

♀ 9.3 μ Ci ($\hat{=}$ 6.3 γ /kg)

Experiment II: ♂ 11.6 μ Ci ($\hat{=}$ 10.4 γ /kg)

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser



ausgeschiedene Urin sofort von der durchströmenden Luft getrocknet wird, Bakterien aber nur in wäßrigem Medium wirksam werden können.

2. Ein - vermutlich großer - Teil des durch Hydroxylierung abgespaltenen Tritium wird - ohne sich homogen im Körperwasser zu verteilen - unmittelbar als HTO ausgeatmet. Dies ist besonders für den Fall vorstellbar, daß nicht wie üblich die Leber das Organ ist, in dem der überwiegende Teil des Steroids hydroxyliert wird, sondern z.B. die Lunge.

Daß auch die Lunge bei der Metabolisierung von Substraten eine Rolle spielen kann, geht aus den Untersuchungen verschiedener Autoren hervor. Gram (101) konnte nachweisen, daß in Kaninchen nicht nur in der Leber, sondern auch in der Lunge Cytochrom P-450 sowie andere Hydroxylasen enthalten sind. Nicholas und Kim (102) fanden bei der Untersuchung des Cortison/Cortisol-Stoffwechsels in Ratten und Meerschweinchen in der Lunge polare Metabolite, bei denen es sich nicht um Glucuronide handelte. Sie wurden nicht weiter identifiziert.

Wir erhofften uns deshalb von der Prüfung der Organspezifität der Hydroxylierung (Kap. C.2.3.) eine Erklärung für den erstaunlichen in vivo Befund.

2.2. Die Altersabhängigkeit der 2-Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in Ratten

Normalerweise beginnt die Ausstattung eines Organs mit einem charakteristischen Enzymmuster in der Embryonalzeit und kommt oft schon wenige Tage nach der Geburt zum Abschluß. Bei sexualspezifischen Enzymen dagegen erfolgt eine altersabhängige Entwicklung, d.h. die Enzymaktivität ist im infantilen Organismus am geringsten und steigt mit zunehmendem Lebensalter bis zu einem bestimmten Höchstwert an.

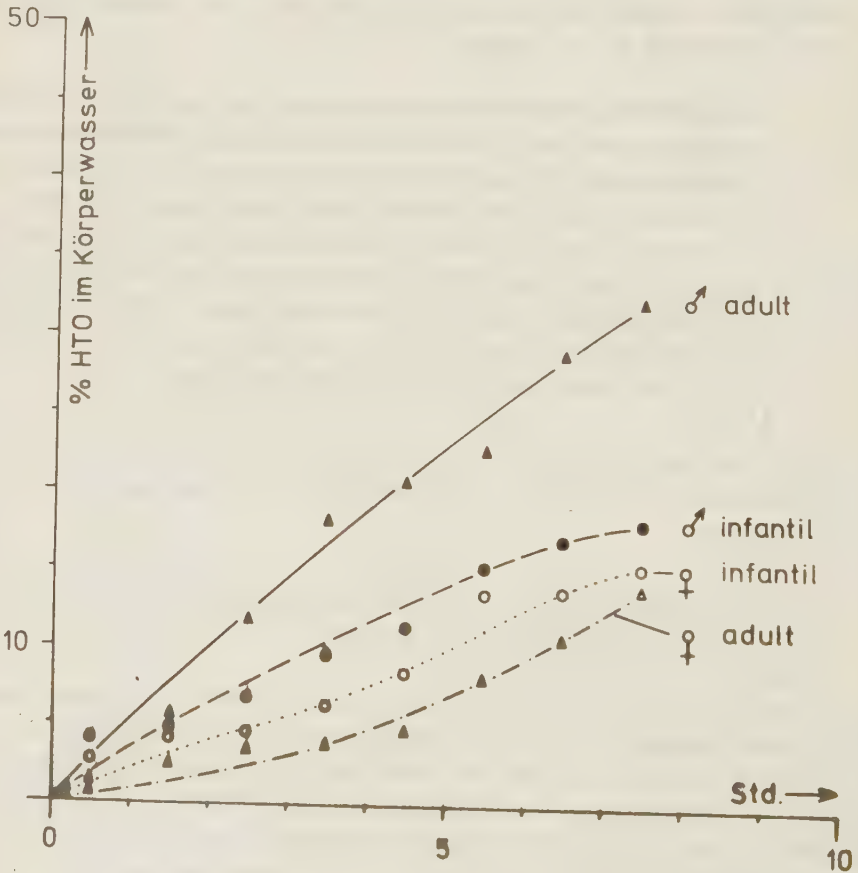
ABB. 14: ALTERSABHÄNGIGKEIT DER IN VIVO HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON IN RATTEN ♂ UND ♀ (RADIOSPIROMETRIE)

i.p. Injektion von [1 α ,2 α -T]-Testosteron pro Tier:

infantil: ♂ 1.3 μ Ci ($\hat{=}$ 17.7 γ /kg) ♀ 1.3 μ Ci ($\hat{=}$ 20.8 γ /kg)

adult: ♂ 6.0 μ Ci ($\hat{=}$ 12.0 γ /kg) ♀ 6.0 μ Ci ($\hat{=}$ 12.0 γ /kg)

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser



TAB. 9: ALTERSABHÄNGIGKEIT DER 2 α -HYDROXYLIERUNG VON
TESTOSTERON IN RATTENLEBER ♂ UND ♀

50 mg Leberschnitte ♂ bzw. ♀ wurden 10 Min. bei 37°C in 1.0 ml Krebs-Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) mit [1 α ,2 α -T]-Testosteron inkubiert.

*100 mg Gewebe

Experiment I: Steroid-Konzentration 10⁻⁴ mol/l (n = 5)

Experiment II: Steroid-Konzentration 10⁻⁵ mol/l (n = 4)

Alter der Tiere	Experiment I			Experiment II		
	HTO	2 α -OH-Test.	Faktor (Leber=1.00)	HTO	2 α -OH-Test.	Faktor (Leber=1.00)
	%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$		%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	
adult ♂	7.91* ± 0.09	15.8 ± 0.18	1.00	6.64 ± 0.14	2.66 ± 0.057	1.00
infantil ♂	2.21* ± 0.09	4.42 ± 0.19	0.28	0.78 ± 0.02	0.31 ± 0.008	0.12
adult ♀	1.63 ± 0.25	6.52 ± 0.88	1.00	0.85 ± 0.03	0.34 ± 0.014	1.00
infantil ♀	1.0 ± 0.12	4.0 ± 0.48	0.61	0.85 ± 0.02	0.34 ± 0.008	1.00

Schriebers und Mitarbeiter (103) untersuchten die Ontogenese verschiedener Enzymaktivitätsmuster des Steroidhormon-Stoffwechsels in der Rattenleber und stellten einen sexuell indifferenten Aktivitätsanstieg während der ersten 30 Lebenstage und eine darauffolgende Einstellung auf ein sexualspezifisches Aktivitätsplateau fest.

Da die 2-Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron geschlechtsspezifisch ist (siehe Kap. C.2.1.), lag eine Untersuchung der altersabhängigen Entwicklung der 2 α -Hydroxylase-Aktivität nahe. Wir bestimmten deshalb in vivo durch Radiospirometrie und in vitro mit Leberschnitten die Hydroxylierungsrate dieser Steroide bei 20 Tage alten männlichen und weiblichen Ratten.

Der Verlauf der in vivo Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron innerhalb von 8 Stunden nach Injektion des Steroids in infantilen und erwachsenen Ratten zeigt, wie unterschiedlich männliche und weibliche Tiere reagieren. Wie erwartet ist bei infantilen männlichen Tieren die Enzymaktivität geringer als bei erwachsenen. Innerhalb von 8 Stunden werden in infantilen Tieren 44 % weniger Testosteron (Abb. 14) und 33 % weniger 5 α -Dihydrotestosteron (Abb. 15) als in erwachsenen hydroxyliert.

Bei der Inkubation von Leberschnitten ergeben sich noch größere Unterschiede. Setzt man die Hydroxylierungsrate bei erwachsenen Tieren gleich 100%, so sinkt in infantilen Tieren die Hydroxylierung von Testosteron auf 12 % bzw. 28 % (Tab. 9) und von 5 α -Dihydrotestosteron auf 32 % bzw. 41 % (Tab. 10).

In weiblichen Tieren steigt die Enzymaktivität nicht mit zunehmendem Alter bis zu einem bestimmten Endwert an. In vivo und in vitro Untersuchungen ergaben, daß Testosteron (Abb. 14 und Tab. 9) in beiden Altersstufen in fast demselben Maße hydroxyliert wird. Noch ungewöhnlicher sind die Befunde bei 5 α -Dihydrotestosteron. In infantilen Tieren steigt die Hydroxylierungsrate in vitro um 50 % (Tab. 10) und in vivo sogar um fast 100 % (Abb. 15). Vergleicht man die absoluten Mengen an gebildetem Hydroxylierungsprodukt [$\text{nmol/min} \cdot \text{g}_{\text{Leber}}$], so wird deutlich, daß eine sexuelle Differen-

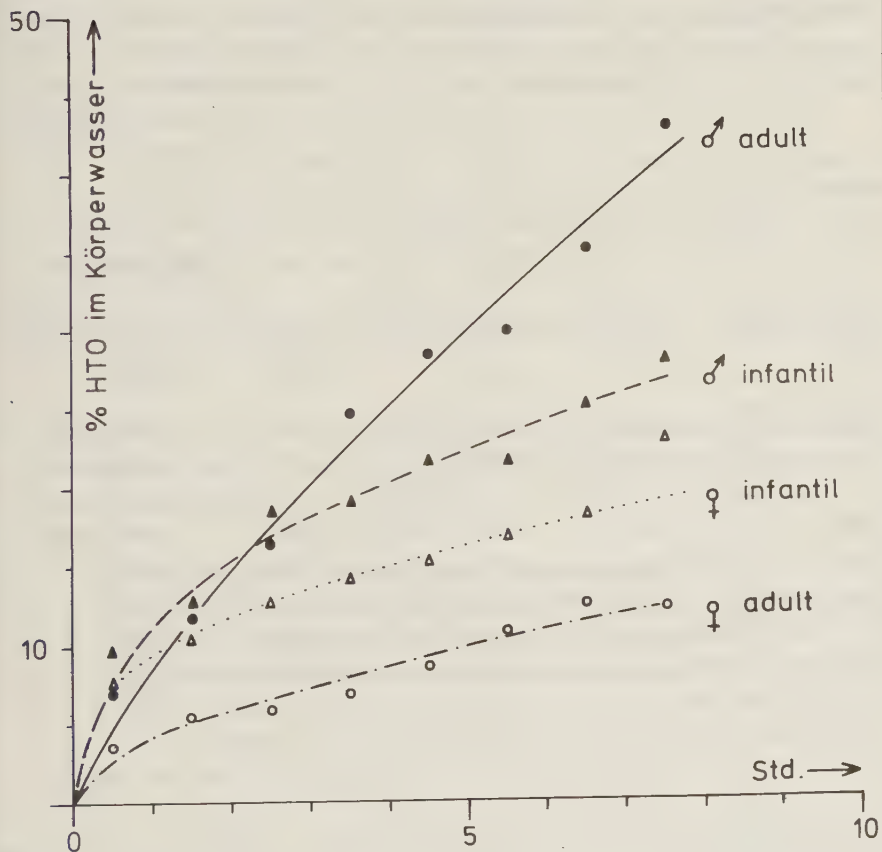
ABB. 15: ALTERSABHÄNGIGKEIT DER IN VIVO HYDROXYLIERUNG VON 5 α -DHT IN RATTEN ♂ UND ♀ (RADIOSPIROMETRIE)

i.p. Injektion von [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron pro Tier:

infantil: ♂ 1.1 μ Ci ($\hat{=}$ 17.7 γ /kg) ♀ 1.1 μ Ci ($\hat{=}$ 18.1 γ /kg)

adult: ♂ 4.8 μ Ci ($\hat{=}$ 13.9 γ /kg) ♀ 4.8 μ Ci ($\hat{=}$ 12.6 γ /kg)

Ordinate: % d. eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser



TAB. 10: ALTERSABHÄNGIGKEIT DER 2 α -HYDROXYLIERUNG VON
5 α -DIHYDROTESTOSTERON IN RATTENLEBER ♂ UND ♀

50 mg Leberschnitte ♂ bzw. ♀ wurden 10 Min. bei 37°C in 1.0 ml Krebs-Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) mit [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron inkubiert.

*100 mg Gewebe

Experiment I: Steroid-Konzentration 10⁻⁴ mol/l (n = 5)

Experiment II: Steroid-Konzentration 10⁻⁵ mol/l (n = 4)

Alter der Tiere	Experiment I			Experiment II		
	HTO	2 α -OH-DHT	Faktor (adult = 1.00)	HTO	2 α -OH-DHT	Faktor (adult = 1.00)
	%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$		%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	
adult ♂	5.55*	11.1	1.00	6.60	2.64	1.00
	± 0.11	± 0.22		± 0.14	± 0.058	
infantil ♂	2.14*	4.13	0.41	2.08	0.83	0.32
	± 0.05	± 0.09		± 0.17	± 0.068	
adult ♀	2.37	9.48	1.00	0.96	0.38	1.00
	± 0.11	± 0.04		± 0.03	± 0.013	
infantil ♀	3.73	14.9	1.57	1.51	0.60	1.57
	± 0.64	± 2.56		± 0.09	± 0.04	

zierung bei 20 Tage alten Tieren noch nicht vorhanden ist. Sie setzt erst später ein, denn in männlichen Ratten steigt die Enzymaktivität mit zunehmendem Alter an, bei weiblichen dagegen bleibt sie gleich oder nimmt wieder ab.

2.3. Organspezifität der 2-Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in Ratten und Meerschweinchen

Im Anschluß an die in vivo Versuche, die bei den männlichen Ratten etwa 3mal höhere Hydroxylierungsraten ergeben hatten als bei Weibchen, sollte die Tritium-Labellisierung in ausgewählten Organen in vitro gemessen werden. Ziel dieser Untersuchungen war die Beantwortung der Fragen

1. Ist ausschließlich die Leber für die Inaktivierung der Hormone verantwortlich oder findet auch in anderen Organen ein nennenswerter Abbau statt?
2. Hängt der Hydroxylase-Gehalt einzelner Organe ab von Art und Geschlecht der Tiere?
3. Ergibt sich aus der organspezifischen Hydroxylierung eine Erklärung für den ungewöhnlichen in vivo Befund bei männlichen Meerschweinchen?

Von den Stoffwechsel- und Sexualorganen männlicher und weiblicher Ratten und Meerschweinchen wurden Schnitte angefertigt und nach der Inkubation mit [1 α ,2 α -T]-Testosteron und [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron das abgespaltene Tritium als HTO bestimmt. Gemäß den Ergebnissen und Schlußfolgerungen aus den Kapiteln C.1.1.5. und C.1.1.6. ist die Menge an gebildetem Tritiumwasser ein Maß für die Hydroxylierung der Steroide an Position 2.

Bei männlichen Ratten (Tab. 11) ist die Leber das einzige Organ, in welchem aus beiden Steroiden eine gleich große Menge Tritium abgespalten wird. Die HTO-Bildung beträgt unter den gewählten Versuchsbedingungen (10^{-5} mol/l, 10 Min., 50 mg Gewebe) für Testosteron

TAB. 11: ORGANSPEZIFITÄT DER 2 α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON
UND 5 α -DIHYDROTESTOSTERON IN RATTEN ♂

Gewebeschnitte ♂ wurden mit [1 α ,2 α -T]-Testosteron bzw.
[1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron bei 37°C in 1.0 ml Krebs-
Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) inkubiert (n = 4).

Experiment I: 50 mg Gewebe, 10 Min., Steroid-Konz. 10⁻⁵ mol/l

Experiment II: 50 mg Gewebe, 10 Min., Steroid-Konz. 10⁻⁴ mol/l

Experiment III: 100 mg Gewebe, 30 Min., Steroid-Konz. 10⁻⁵ mol/l

	Organ	HTO	2 α -OH- Test.	Faktor (Leber=1.00)	HTO	2 α -OH- DHT	Faktor (Leber=1.00)
		%d.e.A.	nmol g . min		%d.e.A.	nmol g . min	
Experiment I	Leber	6.81 ± 0.21	2.72 ± 0.08	1.00	6.26 ± 0.21	2.57 ± 0.01	1.00
	Niere	0.25 ± 0.04	0.10 ± 0.02	0.04	2.99 ± 0.07	1.20 ± 0.03	0.48
	Nebenniere	0.36 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.06	5.93 ± 1.57	2.37 ± 0.63	0.92
	Samenblase	0.03 ± 0.003	0.01 ± 0.001	.004	1.11 ± 0.03	0.44 ± 0.01	0.18
	Testis	0.16 ± 0.01	0.06 ± 0.004	0.02	1.62 ± 0.03	0.65 ± 0.01	0.25
	Prostata	0.16 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.02	3.06 ± 0.07	1.22 ± 0.03	0.48
Experiment II	Leber	6.75 ± 1.15	25.1 ± 3.1	1.00	8.53 ± 0.99	34.1 ± 3.9	1.00
	Nebenniere	0.27 ± 0.02	1.07 ± 0.04	0.04	11.64 ± 0.28	46.6 ± 1.18	1.37
	Lunge	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.06	.006	3.34 ± 0.27	13.4 ± 1.08	0.39
Experiment III	Leber	8.15 ± 0.16	0.54 ± 0.01	1.00	7.82 ± 0.09	0.52 ± 0.01	1.00
	Niere	0.56 ± 0.007	0.04 ± 0.005	0.07	4.76 ± 0.54	0.32 ± 0.04	0.61
	Prostata	0.36 ± 0.06	0.02 ± 0.004	0.04	4.65 ± 0.48	0.31 ± 0.03	0.59

6.8 % und für 5 α -Dihydrotestosteron 6.3 % der eingesetzten Aktivität, das entspricht 2.72 bzw. 2.57 nmol OH-Produkt/min $\cdot$ g_{Leber}. Bei der 10-fachen Substratkonzentration (Experiment II) wird bei etwa gleicher Hydroxylierungsrate aus Testosteron 25.1 nmol und aus 5 α -Dihydrotestosteron 34.1 nmol OH-Produkt/min $\cdot$ g_{Leber} gebildet.

Während die Metabolisierung von Testosteron eindeutig auf die Leber beschränkt ist, wird 5 α -Dihydrotestosteron auch in verschiedenen anderen Organen hydroxyliert: In der Niere und Prostata macht die Hydroxylierungsrate immerhin noch die Hälfte, in Samenblase und Testis ein Fünftel des Leberwertes aus.

Noch mehr erstaunt, daß in der Nebenniere der Steroid-Umsatz nur 10 % niedriger ist als in der Leber. Erhöht man die Substrat-Konzentration auf 10^{-4} mol/l (Tab. 11), so ist die Hydroxylierung in der Nebenniere sogar höher als in der Leber. Außerdem fällt auf, daß auch die Lunge nichtunwesentliche Mengen an 5 α -Dihydrotestosteron-Hydroxylase enthält.

Es ist zu beachten, daß diese Befunde in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten unter verschiedensten Versuchsbedingungen Bestätigung fanden.

Bei weiblichen Ratten (Tab. 12) beträgt die Hydroxylierungsrate in der Leber nur 20 - 30 % dessen, was bei männlichen Tieren gemessen wurde. Arbeitet man mit einer Steroid-Konzentration von 10^{-4} mol/l, so ist die Ausbeute an Hydroxylierungsprodukt mit 6.52 bzw. 8.16 nmol/min $\cdot$ g_{Leber} für Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron fast identisch.

Überraschend hoch ist auch hier wieder der Abbau von 5 α -Dihydrotestosteron in Nebenniere und Lunge (Tab. 12, Experiment II): Im Vergleich zur Leber ist die Enzymaktivität in der Nebenniere 6mal, in der Lunge 1.5mal so hoch. Auffallend ist außerdem, daß es in diesen beiden Organen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede gibt. Die

TAB. 12: ORGANSPEZIFITÄT DER 2 α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON
UND 5 α -DIHYDROTESTOSTERON IN RATTEN ♀

Gewebeschnitte ♀ wurden mit [1 α ,2 α -T]-Testosteron bzw.
[1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron bei 37°C in 1.0 ml Krebs-
Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) inkubiert (n = 4).

Experiment I: 100 mg Gewebe, 30 Min., Steroid-Konz. 10⁻⁵ mol/l

Experiment II: 50 mg Gewebe, 10 Min., Steroid-Konz. 10⁻⁴ mol/l

	Organ	HTO	2 α -OH- Test.	Faktor (Leber=1.00)	HTO	2 α -OH- Test.	Faktor (Leber=1.00)
		%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$		%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	
Experiment I	Leber	0.28	0.02	1.00	1.90	0.13	1.00
		± 0.02	± 0.002		± 0.13	± 0.09	
	Niere	0.20	0.013	0.71	0.73	0.05	0.39
		± 0.003	± 0.002		± 0.06	± 0.004	
	Ovar	0.12	0.008	0.43	0.69	0.05	0.36
		± 0.005	± .0003		± 0.03	± 0.002	
	Uterus	0.03	0.002	0.09	0.53	0.04	0.28
		± 0.001	± .0008		± 0.04	± 0.003	
Experiment II	Leber	1.63	6.52	1.00	2.04	8.16	1.00
		± 0.25	± 0.99		± 0.03	± 0.13	
	Nebenniere	0.21	0.84	0.13	12.63	50.52	6.19
		± 0.02	± 0.16		± 0.25	± 1.00	
	Lunge	0.09	0.34	0.05	2.87	11.5	1.41
		± 0.02	± 0.09		± 0.53	± 2.1	

absoluten Mengen an gebildetem 2α -OH- 5α -Dihydrotestosteron sind in Lunge und Nebenniere von männlichen und weiblichen Ratten gleich.

Zwar konnte auch in Niere, Ovar und Uterus für beide Steroide eine HTO-Bildung nachgewiesen werden, doch liegen die Werte - dargestellt in Tab. 12 (Experiment I) - nur wenig über dem Nullwert.

Im Gegensatz zu Ratten ist - unter identischen Bedingungen - die Metabolisierung von Testosteron in Meerschweinchen (Tab. 13 und 14) nur geringfügig. In sämtlichen Stoffwechsel- und Sexualorganen - selbst in der Leber - wird nicht mehr als 0.3 - 0.5 % des eingesetzten Steroids an C-2 hydroxyliert. Dies entspricht 0.1 - 0.2 nmol OH-Produkt/min . g. Ausgeprägte geschlechts- oder organspezifische Unterschiede lassen sich nicht feststellen.

Dagegen wird 5α -Dihydrotestosteron in allen männlichen und weiblichen Meerschweinchen-Organen hydroxyliert. Gemäß Tab. 13 (σ) und Tab. 14 (ϕ) ist die Hydroxylierungsrate in der Niere und in den Sexualorganen am niedrigsten, etwas höher in der Leber und am ausgeprägtesten in der Nebenniere und Lunge. Durch eine Versuchswiederholung mit höherer Substratkonzentration (Experiment II: 10^{-4} mol/l) konnte dieses Ergebnis verdeutlicht werden. In der Nebenniere von Weibchen ist die Reaktionsgeschwindigkeit 4mal ($\hat{=}$ 33 nmol/min . $g_{\text{Nebenniere}}$), in der männlichen Nebenniere sogar 6mal ($\hat{=}$ 18.7 nmol/min . $g_{\text{Nebenniere}}$) so hoch wie in der entsprechenden Leber. Eine gleichzeitige Überprüfung der Lungenaktivität ergab für weibliche Tiere den Faktor 3 ($\hat{=}$ 23 nmol/min . g_{Lunge}). Bei männlichen Tieren wird in der Lunge 15mal ($\hat{=}$ 44 nmol/min . g_{Lunge}) soviel 5α -Dihydrotestosteron hydroxyliert wie in der Leber ($\hat{=}$ 0.7 nmol/min . g_{Leber}). Ob dieser Befund die bei der in vivo Hydroxylierung scheinbar überhöhte HTO-Bildung (Abb. 13) erklären kann, soll im Abschnitt Diskussion erörtert werden.

Vergleicht man die Ausbeute an Hydroxylierungsprodukt unter dem Aspekt der Geschlechtsspezifität, so wird in der Leber und Nebenniere von männlichen Meerschweinchen weniger, in der Lunge dagegen wesentlich mehr 2α -Hydroxy- 5α -Dihydrotestosteron gebildet als in

TAB. 13: ORGANSPEZIFITÄT DER 2 α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON
UND 5 α -DIHYDROTESTOSTERON IN MEERSCHWEINCHEN ♂

Versuchsdurchführung: siehe Tab. 14

	Organ	HTO	2 α -OH- Test.	Faktor (Leber=1.00)	HTO	2 α -OH- DHT	Faktor (Leber=1.00)
		%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$		%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	
Experiment I	Leber	0.49 ± 0.02	0.19 ± 0.008	1.00	2.56 ± 0.14	1.02 ± 0.05	1.00
	Niere	0.38 ± 0.01	0.15 ± 0.006	0.77	1.42 ± 0.05	0.57 ± 0.02	0.56
	Nebenniere	0.62 ± 0.06	0.24 ± 0.02	1.24	6.42 ± 0.25	2.57 ± 0.10	2.52
	Samenblase	0.32 ± 0.01	0.13 ± 0.005	0.67	1.58 ± 0.09	0.63 ± 0.04	0.62
	Testis	0.34 ± 0.02	0.14 ± 0.007	0.70	1.77 ± 0.18	0.71 ± 0.07	0.69
	Prostata	0.35 ± 0.01	0.14 ± 0.004	0.71	1.70 ± 0.04	0.68 ± 0.02	0.67
Experiment II	Leber (n = 6)	-	-	-	0.74 ± 0.15	2,98 ± 0.59	1.00
	Nebenniere (n = 6)	-	-	-	4.67 ± 1.29	18.70 ± 5.1	6.26
	Lunge (n = 9)	-	-	-	11.01 ± 0.57	44.04 ± 2.28	15.20

TAB. 14: ORGANSPEZIFITÄT DER 2 α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON
UND 5 α -DIHYDROTESTOSTERON IN MEERSCHWEINCHEN ♀

50 mg Gewebeschnitte wurden mit [1 α ,2 α -T]-Testosteron bzw. [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron 10 Min. bei 37°C in 1.0 ml Krebs-Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) inkubiert (n = 4).

Experiment I: Steroid-Konzentration 10⁻⁵ mol/l

Experiment II: Steroid-Konzentration 10⁻⁴ mol/l

Organ		HTO	2 α -OH-Test.	Faktor (Leber=1.00)	HTO	2 α -OH-DHT	Faktor (Leber=1.00)
		%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$		%d.e.A.	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	
Experiment I	Leber	0.45 ± 0.02	0.18 ± 0.007	1.00	3.18 ± 0.18	1.27 ± 0.07	1.00
	Niere	0.39 ± 0.005	0.16 ± 0.002	0.86	1.61 ± 0.12	0.64 ± 0.05	0.51
	Nebenniere	0.49 ± 0.02	0.20 ± 0.007	1.09	4.05 ± 0.12	1.62 ± 0.05	1.27
	Uterus	0.35 ± 0.01	0.14 ± 0.004	0.76	1.25 ± 0.11	0.50 ± 0.04	0.39
	Ovar	0.40 ± 0.02	0.16 ± 0.006	0.87	0.99 ± 0.09	0.40 ± 0.04	0.31
Experiment II	Leber	-	-	-	1.94 ± 0.08	7.77 ± 0.33	1.00
	Nebenniere	-	-	-	8.24 ± 0.31	33.0 ± 1.22	4.25
	Lunge	-	-	-	5.70 ± 0.62	22.80 ± 2.48	2.94

Weibchen. In den Sexualorganen hingegen sind die geschlechtsspezifischen Unterschiede nicht nennenswert.

Meerschweinchen- und Rattenorgane zeigen in der Aktivitätsverteilung der Hydroxylase von 5 α -Dihydrotestosteron gravierende Unterschiede. Nur in der Leber von weiblichen Tieren ist die Hydroxylierungsrate gleich, im übrigen ist die Enzymaktivität in der Lunge in Meerschweinchen höher, in allen übrigen Organen niedriger als in Ratten. Die männliche Meerschweinchenleber weist z.B. nur 10% der Hydroxylase-Aktivität von Rattenleber auf.

Die Metabolisierung von Testosteron ist in Meerschweinchen so gering, daß auf einen ausführlichen Vergleich mit Ratten verzichtet wird.

2.4. Inhibierung der 2 α -Hydroxylierung durch Metopiron und Cyproteronacetat

Cyproteronacetat (1,2 α -Methylen-6-chlor- $\Delta^{4,6}$ -Pregnadien-17 α -ol-3,20-dion-17acetat) ist seit einigen Jahren als besonders wirksames Antiandrogen bekannt. Es soll in den Zielorganen die Bindung des Testosteron an die Rezeptoren hemmen (104, 105). Außerdem werden die androgenbildenden Enzymsysteme in Testis sowie andere Enzyme des Steroidstoffwechsels beeinflußt. Zum Beispiel wird die 21-Hydroxylierung von 17 α -OH-Progesteron und die Bildung polarer Metabolite bei der Biosynthese von C₁₉-Steroiden vermindert (106, 107).

Wegen der ausgeprägten Geschlechtsspezifität der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hydroxylierungsreaktion (s. C.2.1.) liegt es nahe zu fragen: Übt das Antiandrogen einen Einfluß aus auf die Aktivität der 2 α -Hydroxylase von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in männlichen Ratten?

In vivo Untersuchungen (Abb. 16) zeigten, daß durch die gleichzeitige Injektion von Cyproteronacetat und Steroid die Hydroxylierung des Testosteron innerhalb von 8 Stunden auf die Hälfte des Kontrollwertes reduziert wird: Das bedeutet, mit Cyproteronacetat behandelte

ABB. 16: HEMMUNG DER 2 α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON UND 5 α -DHT IN VIVO DURCH CYPROTERONACETAT (RADIOSPIROMETRIE)

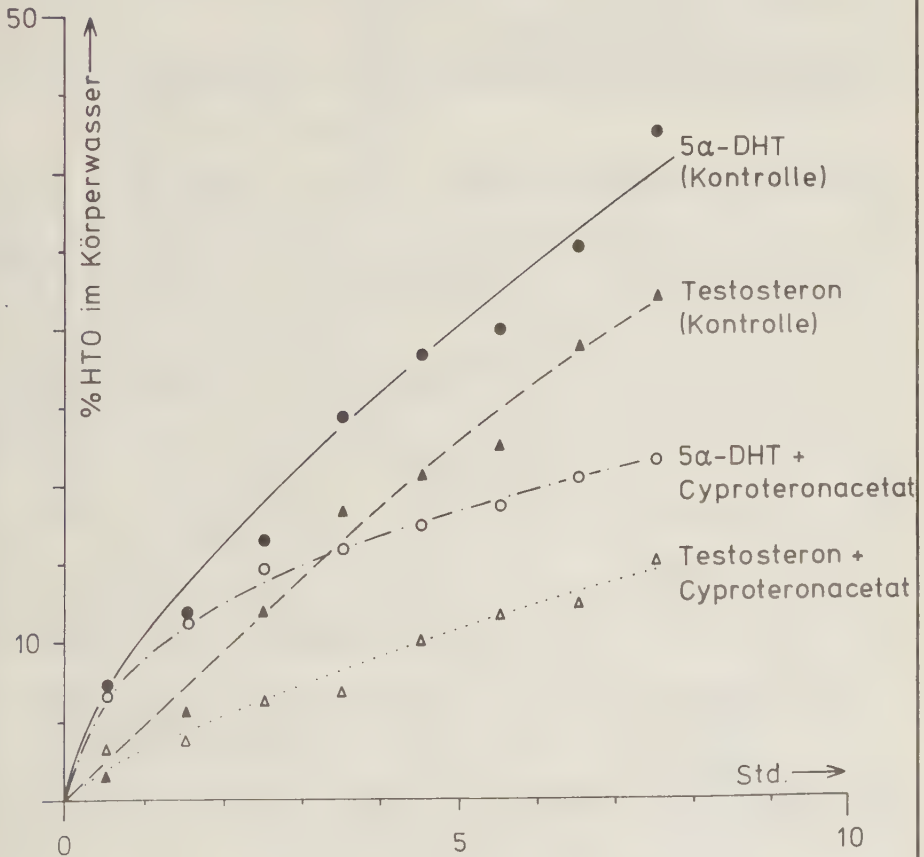
i.p. Injektion der Steroide mit Cyproteronacetat pro Ratte ♂ :

[1 α ,2 α -T]-Testosteron: 6 μ Ci ($\approx$ 16.5 γ /kg) + 6 mg/kg Cyproteronacetat

[1 α ,2 α -T]-5 α -DHT: 5 μ Ci ($\approx$ 13.0 γ /kg) + 6 mg/kg Cyproteronacetat

Kontrolle: siehe Abb. 12

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser



TAB. 15: IN VITRO INHIBIERUNG DER 2 α -HYDROXYLIERUNG VON
TESTOSTERON UND 5 α -DHT DURCH METOPIRON UND
CYPROTERONACETAT IN RATTENORGANEN ♂

Steroid und Hemmstoff wurden mit 100 mg Gewebeschnitten ♂ 10 Min. bei 37°C in 1.0 ml Krebs-Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) inkubiert. (Mittelwerte $\pm \sigma$ für n = 4)

Substrat: [1 α ,2 α -T]-Testosteron 10⁻⁵ mol/l

[1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron 10⁻⁵ mol/l

Inhibitor: Metopiron 10⁻³ mol/l

Cyproteronacetat 10⁻³ mol/l

HTO-Bildung bei den Kontrollwerten in % d. eing. Akt. :

[1 α ,2 α -T]-Testosteron Leber 8.6 $\pm$ 0.23

Prostata 0.39 $\pm$ 0.05

[1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron: Leber 6.8 $\pm$ 0.32

Prostata 1.29 $\pm$ 0.05

Organ	Inhibitor	2 α -OH-Testosteron		2 α -OH-5 α -Dihydro-Testosteron	
		$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	Faktor ohne In- hibitor = 1.00	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	Faktor ohne In- hibitor = 1.00
Leber	-	1.72 $\pm$ 0.05	1.00	1.36 $\pm$ 0.06	1.00
	Metopiron	1.27 $\pm$ 0.01	0.74	0.91 $\pm$ 0.05	0.67
	Cyproteron- acetat	1.34 $\pm$ 0.01	0.78	1.05 $\pm$ 0.03	0.77
	-	0.08 $\pm$ 0.01	1.00	0.26 $\pm$ 0.01	1.00
Prostata	-	0.02 $\pm$ 0.002	0.28	0.15 $\pm$ 0.003	0.57
	Metopiron	0.03 $\pm$ 0.01	0.41	0.22 $\pm$ 0.01	0.85
	Cyproteron- acetat				
	-				

Rattenmännchen zeigen die gleiche Hydroxylierungsrate wie erwachsene Weibchen (vergleiche Abb. 12).

Die Hydroxylierung von 5 α -Dihydrotestosteron wird im gleichen Zeitraum um Zweidrittel der Kontrolle gehemmt und entspricht dann interessanterweise der Enzymaktivität bei weiblichen infantilen Tieren (vergleiche Abb. 15).

Nach diesen in vivo Befunden interessierte natürlich, in welchen Organen speziell das Antiandrogen wirksam ist. Wir untersuchten als Stoffwechselorgan die Leber und als Erfolgsorgan die Prostata. Dabei stellten wir fest, daß sich die Hydroxylierung in vitro durch Cyproteronacetat nicht so effektiv hemmen läßt wie durch die gleichzeitige Injektion von Steroid und Inhibitor in vivo. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

In der Leber sinkt die Hydroxylase-Aktivität sowohl von Testosteron als auch von 5 α -Dihydrotestosteron nur um 22 %. In der Prostata reagieren die beiden Steroide unterschiedlich. Während die Hydroxylierung von Testosteron um 59 % herabgesetzt wird, beträgt bei 5 α -Dihydrotestosteron die Hemmung nur 15 %. Auffallend ist, daß der Einfluß des Antiandrogens auf die Testosteron-Hydroxylierung in der Prostata größer ist als in der Leber. Jedoch muß bei diesem Befund bedacht werden, daß es sich in der Prostata um die Hemmung einer ohnehin nur geringfügig ablaufenden Reaktion handelt. Bei der Inhibierung der 5 α -Dihydrotestosteron-Hydroxylase gibt es keinen organspezifischen Unterschied.

Metopiron (1-Oxo-1-pyridino-[3']-2-methyl-2-pyridino-[3']-propan) ist als Inhibitor von Hydroxylierungsreaktionen bekannt (89 - 91).

Hemmt Metopiron auch die 2 α -Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron?

Es wurde 18, 15, 13, 2 Stunden vor Versuchsbeginn und gleichzeitig mit dem Steroid 10 mg/kg Metopiron injiziert (127) und die HTO-Bil-

ABB. 17: EINFLUSS VON METOPIRON AUF DIE 2 α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON UND 5 α -DHT IN VIVO (RADIOSPIROMETRIE)

i.p. injizierte Aktivität pro Ratte ♂:

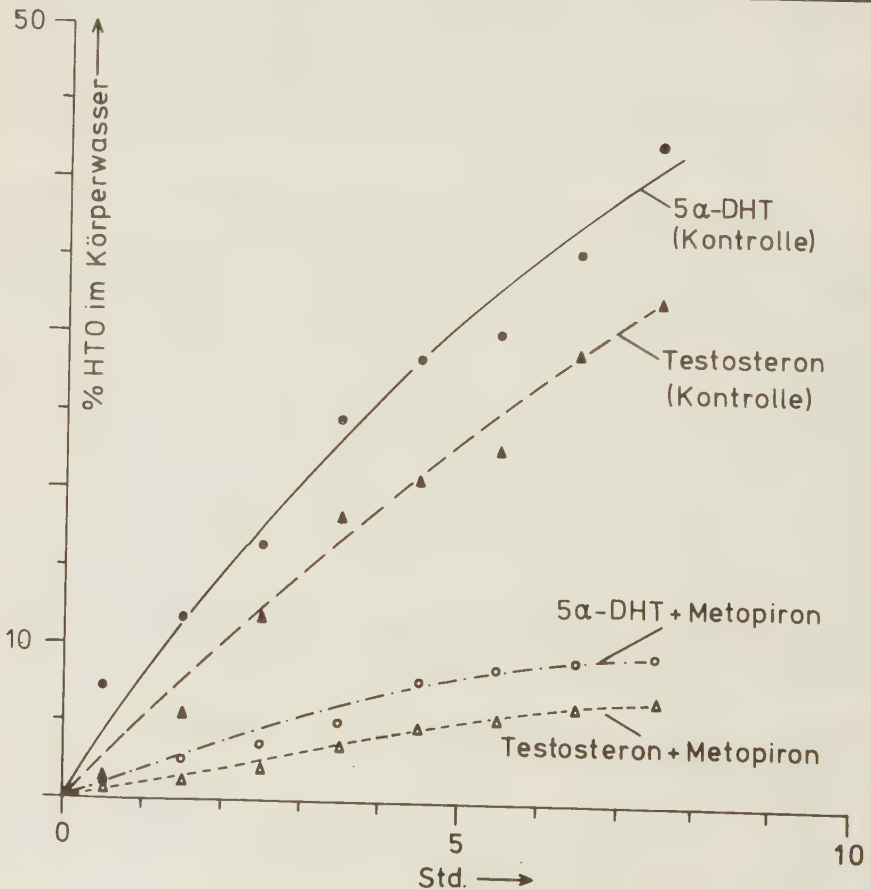
[1 α ,2 α -T]-Testosteron: 6 μ Ci ($\hat{=}$ 15.8 γ /kg)

[1 α ,2 α -T]-5 α -DHT : 5 μ Ci ($\hat{=}$ 11.6 γ /kg)

Metopiron-Gabe: 18, 15, 13, 2 Stunden vor Versuchsbeginn und gleichzeitig mit dem Steroid wurde den Tieren je 10 mg/kg Metopiron appliziert.

Kontrolle: siehe Abb. 12

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser



dung in vivo durch Radiospirometrie bestimmt. Gemäß Abb. 17 ist 8 Stunden nach Applikation des Substrats die Hydroxylierungsrate bei den Steroiden auf rund ein Fünftel des Kontrollwertes reduziert.

Dieser beachtliche Einfluß von Metopiron auf die Hydroxylierung in vivo läßt sich laut Tabelle 15 in vitro jedoch nicht nachweisen.

In der Leber wird die Reaktion bei Testosteron um 25% und bei 5 α -Dihydrotestosteron um 30 % gehemmt, also um ein Drittel dessen, was in vivo als Hemmeffekt auftritt. In der Prostata ist der Effekt von Metopiron etwas deutlicher, als in der Leber. Die Hydroxylierung von 5 α -Dihydrotestosteron wird um 40 % und von Testosteron sogar um 70 % geringer. Es ist unverständlich, warum die Hydroxylierung von Testosteron in vitro nicht so stark gehemmt wird wie in vivo, zumal in diesem Fall die Leber Hauptort der Hydroxylierung ist (vergleiche Tab. 11). Der größere Effekt in der Prostata verliert dadurch an Bedeutung, daß - ebenso wie bei der Hemmung durch Cyproteronacetat - der Abbau von Testosteron in diesem Organ sehr gering ist.

Bei 5 α -Dihydrotestosteron ist eine Übereinstimmung zwischen in vivo und in vitro Befunden eher zu erkennen, wenn man bedenkt, daß die Hydroxylierung ebenso wie ihre Inhibierung in mehreren Organen (vergleiche Tab. 11) stattfindet und in vivo die Summe dieser Reaktionen gemessen wird.

2.5. Einfluß von Hunger und Schädigung der Leber durch CCl₄ auf die Hydroxylase-Aktivität in Ratten ♂

Erste Untersuchungen der Ursache von Lebervergiftungen durch Tetrachlorkohlenstoff ließen eine Störung der Protein-Biosynthese (108) sowie eine Schädigung des Endoplasmatischen Reticulum (109) vermuten. Anhand des Abbaus bestimmter Arzneimittel konnte man nachweisen, daß nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff die Aktivität der mikrosomalen Leberenzyme - wahrscheinlich durch Zerstörung des Cytochrom P-450 - herabgesetzt wurde (110, 125). Da in Lebermikrosomen die Hydroxylierung von Arzneimitteln und Steroiden vermutlich

von gleichen Faktoren beeinflusst wird (45), lag es nahe, auch die Wirkung von Tetrachlorkohlenstoff auf den Steroid-Abbau zu prüfen. Levin und Mitarbeiter (126) stellten z.B. fest, daß nach CCl_4 -Gaben in Ratten das Uterus-Wachstum erhöht und die Steroid-Hydroxylierung vermindert ist.

Auch Nahrungsentzug beeinflusst die Metabolisierung der Steroide. Nach Untersuchungen von Schriebers (116) nimmt z.B. die Cortisonhydrierung in Rattenleber beim hungernden Tier ab, da der für die Hydrierung benötigte Wasserstoff in Form von NADPH nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung steht. Die Enzymmenge dagegen bleibt unverändert.

Wie stark wirkt sich ein Leberschaden auf die 2α -Hydroxylierung von Androgenen aus?

Um dies zu prüfen, wurde die HTO-Bildung aus $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]\text{-Testosteron}$ und $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]\text{-}5\alpha\text{-Dihydrotestosteron}$ in vivo (Radiospirometrie) und in vitro (Leberschnitte) gemessen, nachdem die Tiere wie folgt behandelt worden waren:

1. Sie hatten entweder 60 Stunden keine Nahrung, aber Wasser ad libitum bekommen oder
2. es wurde an zwei aufeinander folgenden Tagen alle 12 Stunden je 0.5 ml CCl_4/kg subkutan injiziert und am 3. Tag der Versuch durchgeführt. (Dies entsprach in etwa der von Sasame et al. (110) verabreichten Dosis.)

Vergleicht man 7 Stunden nach Injektion des Steroids die HTO-Bildung aus $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]\text{-Testosteron}$ in gesunden mit derjenigen in vorbehandelten Tieren, so zeigt sich eine Verminderung der Hydroxylierungsrate durch Nahrungsmangel und Vergiftung mit Tetrachlorkohlenstoff um jeweils 60 % (Abb. 19).

Eine noch deutlichere Hemmung läßt sich gemäß Tab. 16 in Leberschnitten bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen nachweisen.

ABB. 18: IN VIVO HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON IN RATTEN ♂
NACH HUNGER UND SCHÄDIGUNG DER LEBER DURCH CCl_4
(RADIOSPIROMETRIE)

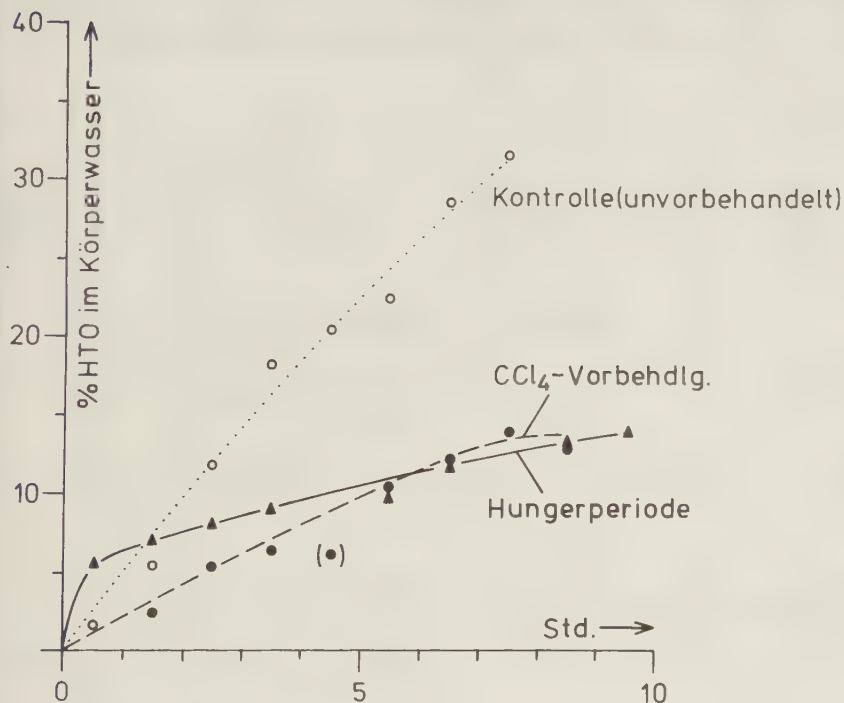
i.p. Injektion von $[1\alpha,2\alpha\text{-}^3\text{H}]\text{-Testosteron}$ pro Tier:

6.0 $\mu\text{Ci} \hat{=} 12.0 \text{ } \gamma/\text{kg}$ (Kontrolle)

8.3 $\mu\text{Ci} \hat{=} 23.1 \text{ } \gamma/\text{kg}$ (Hunger-Periode: 60 Std.)

6.0 $\mu\text{Ci} \hat{=} 25.5 \text{ } \gamma/\text{kg}$ (CCl_4 -Vorbehandlung: subkutane Injektion
von je 0.5 ml CCl_4/kg alle 12 Std. an zwei
aufeinander folgenden Tagen. Am 3.Tag Bestimmung der HTO-Bildung.)

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser



TAB. 16: DIE 2 α -HYDROXYLIERUNG VON TESTOSTERON IN
RATTENLEBER ♂ NACH HUNGER UND SCHÄDIGUNG
DER LEBER DURCH CCl₄

50 mg Leberschnitte ♂ wurden 10 Min. bei 37°C in 1.0 ml Krebs-Ringer-PO₄-Puffer pH 7.4 mit [1 α ,2 α -T]-Testosteron inkubiert (Mittelwerte $\pm \sigma$ für n = Anzahl der Bestimmungen).

Steroid-Konzentration: Experiment I 10⁻⁵ mol/l

Experiment II 10⁻⁴ mol/l

Vorbehandlung der Tiere: siehe Abb. 18

HTO-Bildung bei den Kontrollwerten in % d. eing. Akt. :

Experiment I : 6.81 $\pm$ 0.21

Experiment II : 6.28 $\pm$ 0.77

Vorbehand- lung der Tiere	2 α -OH-Testosteron				
	Experiment I		Experiment II		in vivo [7 Std. p.i.] [vergl. Abb. 18]
	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	Faktor (Kontr. = 1.00)	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	Faktor (Kontr. = 1.00)	Faktor (Kontr. = 1.00)
Kontrolle (n = 8)	2.72 $\pm$ 0.08	1.00	25.1 $\pm$ 3.1	1.00	1.00
CCl ₄ -Inj. (n = 4)	1.04 $\pm$ 0.05	0.38	5.1 $\pm$ 0.52	0.20	0.43
Hunger (n = 4)	0.71 $\pm$ 0.03	0.26	4.5 $\pm$ 0.19	0.18	0.43

ABB. 19: IN VIVO HYDROXYLIERUNG VON 5α -DIHYDROTESTOSTERON IN RATTEN ♂ NACH HUNGER UND SCHÄDIGUNG DER LEBER DURCH CCl_4 (RADIOSPIROMETRIE)

i.p. Injektion von $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]-5\alpha\text{-DHT}$:

pro Tier: $4.8 \mu\text{Ci} \hat{=} 13.9 \gamma/\text{kg}$ (Kontrolle)

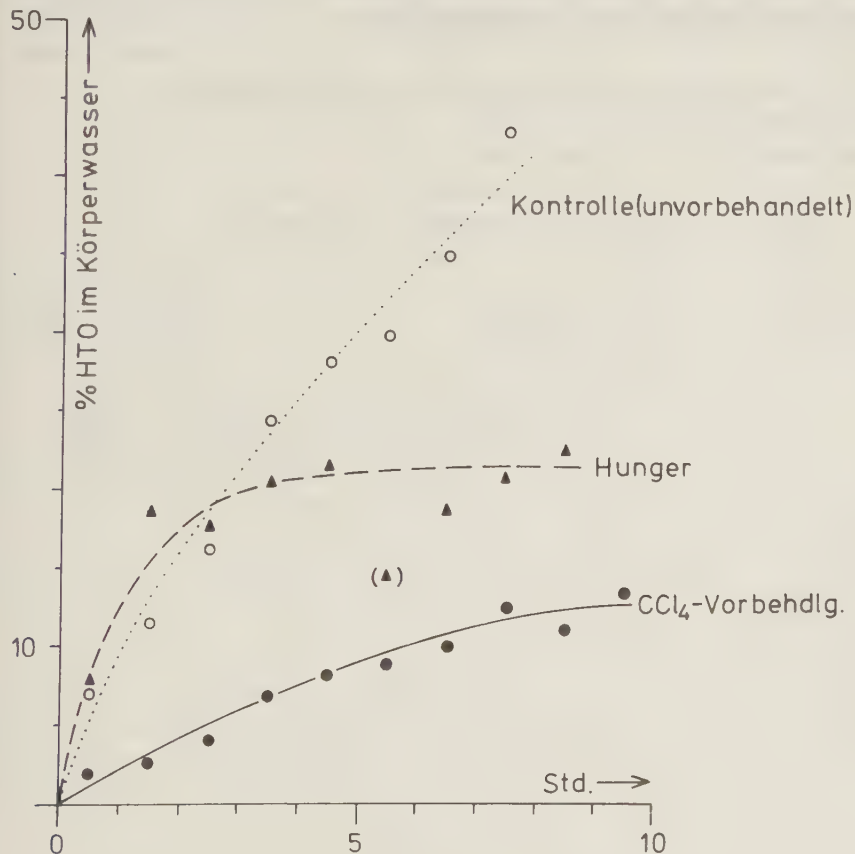
6 $\mu\text{Ci} \hat{=} 27.5 \gamma/\text{kg}$ (Hunger-Periode: 60 Std.)

7 $\mu\text{Ci} \hat{=} 22.5 \gamma/\text{kg}$ (CCl_4 -Vorbehandlung: subkutane

Injektion von je 0.5 ml CCl_4/kg alle 12

Stunden an zwei aufeinander folgenden Tagen. Am 3. Tage Bestimmung der HTO-Bildung.

Ordinate: % der eingesetzten Aktivität, als HTO im Körperwasser



TAB. 17: DIE 2 α -HYDROXYLIERUNG VON 5 α -DIHYDROTESTOSTERON IN RATTELEBER ♂ NACH HUNGER UND SCHÄDIGUNG DER LEBER DURCH CCL₄

50 mg Leberschnitte ♂ wurden 10 Min. bei 37°C in 1.0 ml Krebs-Ringer-PO₄-Puffer (pH 7.4) mit [1 α ,2 α -T]-5 α -DHT inkubiert (Mittelwerte $\pm \sigma$ für n = Anzahl der Bestimmungen).

Steroid-Konzentration: Experiment I 10⁻⁵ mol/l

Experiment II 10⁻⁴ mol/l

Vorbehandlung der Tiere: siehe Abb. 19

HTO-Bildung bei den Kontrollwerten in % d. eing. Akt. :

Experiment I : 6.43 $\pm$ 0.24

Experiment II : 9.55 $\pm$ 0.91

Vorbehand- lung der Tiere	2 α -OH-5 α -Dihydrotestosteron				
	Experiment I		Experiment II		in vivo [7 Std. p.i.] vergl. Abb. 19
	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	Faktor (Kontr. = 1.00)	$\frac{\text{nmol}}{\text{g} \cdot \text{min}}$	Faktor (Kontr. = 1.00)	Faktor (Kontr. = 1.00)
Kontrolle (n = 8)	2.57 $\pm$ 0.1	1.00	38.2 $\pm$ 3.6	1.00	1.00
CCl ₄ -Inj. (n = 4)	1.59 $\pm$ 0.2	0.62	16.9 $\pm$ 1.0	0.44	0.29
Hunger (n = 4)	0.98 $\pm$ 1.0	0.38	15.6 $\pm$ 0.4	0.41	0.53

Laut Abb. 19 und Tab. 17 erzielt man mit $[1\alpha,2\alpha\text{-T}]-5\alpha\text{-Dihydrotestosteron}$ ähnliche Ergebnisse. In vivo ist die $2\alpha\text{-Hydroxylierung}$ 7 Stunden p.i. aufgrund der Hungerperiode um 50 % und der wiederholten Tetrachlorkohlenstoff-Injektion um 70 % eingeschränkt. In Leberschnitten liegt die Inhibierung für beide Versuchsanordnungen bei ungefähr 60 % und damit nicht ganz so hoch wie bei Testosteron.

Ganz allgemein scheint das Ausmaß der Hemmung in vivo und in vitro unabhängig davon zu sein, ob die Tiere durch Entzug von Nahrung oder durch Injektion von Tetrachlorkohlenstoff vorbehandelt wurden. Im übrigen entspricht die Hemmung durch Tetrachlorkohlenstoff in der Größenordnung derjenigen, welche von Levin und Mitarbeitern (126) für die Bildung polarer Metabolite aus Östradiol in vivo bestimmt wurde.

D. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

1. Methodik (Kap. C.1.1.5. und C.1.1.6.)

Die Arbeit beweist erstmals die Hydroxylierung von Testosteron zu 2 α -OH-Testosteron in der Rattenleber. Diese Reaktion ist bisher nur in menschlicher fetaler Leber beschrieben worden (60), in Rattenleber dagegen konnte nur 2 β -OH-Testosteron identifiziert werden. Gemäß Abb. 6 ist sogar die Hydroxylierung an C-2 in α -Position bedeutender als in β -Position.

Vergleicht man die Ausbeuten an hydroxyliertem Testosteron bestimmt durch die HTO-Bildung zum einen und als [4- ^{14}C]-2 α -OH-Testosteron zum anderen, so ergibt sich laut Tab. 5 keine Parallelität. Dies ist verständlich, wenn man - wie bereits in Kap. C.1.1.6. ausführlich diskutiert - die vielen Fehlerquellen berücksichtigt, die eine Verwendung von Lebermikrosomen als Enzymquelle mit sich bringt. Hauptursache der aufgetretenen Diskrepanz scheint zu sein, daß ein Teil des labilisierten Tritium nicht aus Testosteron selbst, sondern aus dem rasch von Lebermikrosomen gebildeten 5 α -Dihydrotestosteron stammt (vergleiche hierzu die $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotienten der Reaktionsprodukte in Abb. 6). Reaktionen, in denen nach Inkubation von Testosteron mit Rattenleber im Ring A gesättigte Hydroxylierungsprodukte entstehen, sind von verschiedenen Autoren beschrieben (51, 38). Solche Sekundär-Reaktionen kann man bei in vitro Untersuchungen durch kurze Inkubationszeiten klein halten.

Verwendet man kristallines Enzym wie z.B. Tyrosinase zur 2-Hydroxylierung von Östradiol (vergleiche S.25), so ist mit Nebenreaktionen nicht zu rechnen und die Gleichung 1 mol HTO = 1 mol OH-Produkt ist gewährleistet (82).

Am Steroid-Molekül sind alle Tritium-Atome von Nachteil, die nicht in die betreffende enzymatische Reaktion mit einbezogen werden. So ist für die Messung der 2 α -Hydroxylierung von Testosteron [2 α -T]-Testosteron besser geeignet als [1 α ,2 α -T]-Testosteron: Die Ausbeute an HTO (bezogen auf die eingesetzte Aktivität) wäre doppelt so hoch wie bei dem von uns eingesetzten Substrat. Außerdem kann man alle Fehlermöglichkeiten ausschalten, die sich durch sekundäre HTO-Bildung an Tritium-haltigen mono-hydroxylierten Produkten ergeben. Dies zeigen Untersuchungen mit [5 α -T]-Dihydrotestosteron (vergleiche Kap. C.1.2.) und [7 α -T]-Cholesterin (128, 129).

Im Vergleich zu Methoden, die auf der aufwendigen Isolierung von Steroid-Metaboliten aus dem Inkubationsansatz, eventuell sogar aus Kot und Harn beruhen, ist die in dieser Arbeit erprobte Methodik zum Studium der Hydroxylierung wesentlich einfacher. Sie ist sowohl bei in vivo als auch in vitro Versuchen zeit- und arbeitssparend und eignet sich gut zum Vergleich von Relativ-Werten.

Die Vorteile sowie Fehlermöglichkeiten der "stoffwechsellabilen Tritiummarkierung" sind in der Zwischenzeit noch in einer anderen Arbeit beschrieben (128). Die Autoren benutzten die Methode zum Nachweis der 7 α -Hydroxylierung des Cholesterin.

2. Biochemie der 2 α -Hydroxylierung (Kap. C.1.1.1. - C.1.1.4.)

Die Metabolisierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron weist die für Hydroxylierungsreaktionen typischen Charakteristika auf: Lokalisation der Hydroxylasen in der Mikrosomenfraktion (Tab. 2), Abhängigkeit von Sauerstoff und Hemmbarkeit der Reaktion durch KCN (Tab. 1)

Die Coenzympezifität (Tab. 2) ist für die beiden Steroide unterschiedlich. Im Gegensatz zu Testosteron kann bei der Hydroxylierung von 5 α -Dihydrotestosteron neben NADPH auch NADH als Cosubstrat fungieren. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß bei der 2-Hydroxylierung von Östradiol (82) die K_m -Werte für die Coenzyme in dem Bereich intrazellulärer NADH bzw. NADPH-Konzentration lie-

gen (136). Falls dies auch für die Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron zutrifft, so kann im Organismus die Androgen-Hydroxylierung durch eine Änderung des Coenzym-Spiegels in der Zelle erheblich beeinflusst werden (vergl. Kap. C.2.5.).

Die in dieser Arbeit für die Hydroxylierung von Androgenen erstmals bestimmten K_m -Werte sind in Tab. 18 nochmals aufgeführt. Sie zeigen eine gute Übereinstimmung mit Michaelis-Konstanten, die von anderen Autoren ermittelt wurden. In Relation zur im Blut vorhandenen Steroid-Konzentration sind sie sehr hoch (130), im Vergleich zu K_m -Werten von Arzneimittel-Hydroxylasen relativ niedrig (131). Da die zur Erreichung der V-Werte erforderlichen Steroid-Konzentrationen in vivo nicht annähernd erreicht werden, wird auf die Angabe der aus Abb. 3a und 3b berechenbaren V-Werte verzichtet. Ein Vergleich des K_m -Wertes für die 2 α -Hydroxylierung ($K_m = 0.5 \cdot 10^{-4}$ mol/l) mit dem für die 5 α -Hydrierung ($K_m = 1.5 \cdot 10^{-4}$ mol/l (21)) von Testosteron läßt den Schluß zu, daß in der Leber bevorzugt die Hydroxylierungsreaktion abläuft und 5 α -Dihydro-Produkte nicht so rasch gebildet werden.

TAB. 18: K_M -WERTE DER STEROID-HYDROXYLIERUNG

Substrat	Hydroxylierung am C-Atom	K_m [mol/l]	Bemerkungen
<u>Diese Arbeit:</u>			
Testosteron	2	$0.5 \cdot 10^{-4}$	Abb. 3a
5 α -DHT	2	$2.0 \cdot 10^{-4}$	Abb. 3b
<u>Literatur-Angaben:</u>			
Östradiol	2	$8.3 \cdot 10^{-4}$	Wenzel (82)
Östradiol	2	$0.5 \cdot 10^{-4}$	Bolt et al. (134)
Äthinyl-Östradiol	2	$0.4 \cdot 10^{-4}$	Bolt et al. (134)
Cholesterol	7	$1.1 \cdot 10^{-4}$	Cantfort et al. (128)
11-Desoxycortico- steron (für NADPH)	11	$0.4 \cdot 10^{-4}$	Wickramasinghe (135)

3. Hat die Dehydrierung von 5 α -Dihydrotestosteron eine biologische Bedeutung ? (Kap. C.1.2.)

Obwohl die von der 5 α -Reduktase katalysierte Umwandlung des Testosteron zum 5 α -Dihydrotestosteron als irreversibel gilt (19, 67), ist immer wieder die mögliche Reversibilität dieser Reaktion diskutiert worden.

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen war deshalb der Gedanke, daß die eigentlich wirksame androgene Komponente entgegen den üblichen Vorstellungen doch Testosteron sei und 5 α -Dihydrotestosteron nur als Speicherform fungiere. Dies hat sich nicht bestätigt. Zum einen findet die Dehydrierung außer in der Prostata als Erfolgsorgan in demselben Ausmaß in den Stoffwechselorganen Leber und Niere statt, zum anderen ist die durch die Rückreaktion gebildete Testosteron-Menge im Vergleich zur im Plasma vorhandenen Steroid-Konzentration unbedeutend (130). Gemäß Tab. 7 werden in der Leber, Niere und Prostata $5 \cdot 10^{-2}$, in der Testis $2 \cdot 10^{-2}$ nmol Testosteron/min $\cdot$ g gebildet. Nach Barin und Peterson (130) ist aber die endogene Testosteron-Konzentration in der Testis etwa um den Faktor 10 höher. Eine Bedeutung der Dehydrierung im Hinblick auf androgene Effekte ist deshalb auszuschließen. Dies trifft insbesondere für die Reaktion in der Prostata zu. Wie ein Vergleich der K_m -Werte in Tab. 6 zeigt, wird in diesem Organ für die Dehydrierung ($K_m = 2.9 \cdot 10^{-4}$ mol/l) 300 mal mehr Substrat benötigt als für die Hydrierung ($K_m = 0.9 \cdot 10^{-6}$ mol/l).

Ist aber 5 α -Dihydrotestosteron tatsächlich das eigentlich wirksame Hormon, so kann die Dehydrierung zu Testosteron ein Schutz sein vor Inaktivierung z.B. durch Hydroxylierung, denn wie eigene Untersuchungen gezeigt haben, wird 5 α -Dihydrotestosteron in der Niere, Nebenniere und Prostata hydroxyliert, nicht aber Testosteron (Tab. 11). Durch die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts von Testosteron zu 5 α -Dihydrotestosteron ist eine Regulation der Hormonwirkung denkbar, eventuell sogar eine Beeinflussung der Hormonsteuerung in der Hypophyse nach Massa und Mitarbeitern (15).

Bei diesen Überlegungen darf aber nicht außer acht gelassen werden, wie minimal die besprochene Reaktion abläuft. Es bleibt offen, ob bei einer Erhöhung der 5 α -Dihydrotestosteron-Konzentration z.B. durch Induktion der 5 α -Reduktase oder durch Inhibierung der weiteren Metabolisierung des Steroids die Reaktion 5 α -Dihydrotestosteron $\longrightarrow$ Testosteron verstärkt auftritt.

4. Sexualspezifität (Kap. C.2.1.)

Nach Untersuchungen verschiedener Autoren verläuft die Metabolisierung von Steroid-Hormonen in Ratten sexualspezifisch. So waren auch bei der von uns untersuchten 2 α -Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron vom Geschlecht abhängige Unterschiede zu erwarten.

Die Steroide werden in vivo sowohl in männlichen als auch in weiblichen Ratten hydroxyliert (Abb. 12). Es existieren jedoch für beide Substrate gleiche quantitative geschlechtsspezifische Unterschiede. Diese sind - wie Tab. 19 zeigt - in vitro wesentlich ausgeprägter als in vivo, wenn man als Vergleichsorgan die Leber wählt. Während das Verhältnis Männchen/Weibchen in vivo 2.7 beträgt, liegt es in vitro bei 6.8. Dies erstaunt nicht bei 5 α -Dihydrotestosteron, da für den Abbau dieses Substrats bei beiden Geschlechtern außer der Leber noch andere Organe eine Rolle spielen (vergleiche Tab. 11) und die Ergebnisse der in vivo Messungen mitbestimmen. Schwer erklärbar ist der Befund hingegen bei Testosteron, dessen Hydroxylierung außerhalb der Leber bedeutungslos ist.

In diesem Zusammenhang ist außerdem darauf hinzuweisen, daß in Leberschnitten männlicher Ratten für Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron identische Hydroxylierungsraten gemessen werden, daß hingegen die in vivo Hydroxylierungsrate bei 5 α -Dihydrotestosteron um den Faktor 1.2 höher ist. Dies läßt sich leicht durch die oben erwähnte unterschiedliche organspezifische Hydroxylierung der Steroide erklären.

Die zunächst überraschenden in vivo Befunde bei der 2 α -Hydroxylierung von 5 α -Dihydrotestosteron in männlichen Meerschweinchen (Abb. 13) finden eine plausible Erklärung in der Organspezifität der Reaktion. Da das Substrat in der Leber kaum, in der Lunge dagegen in beträchtlichem Ausmaß abgebaut wird, ergibt sich laut Tab. 13 (Exp. II) für den Umsatz in diesen Organen das Verhältnis Leber/Lunge = 0.07. In vivo ist deshalb folgender Reaktionsablauf denkbar: Das in der Lunge gebildete HTO wird zu einem großen Teil ausgeatmet bevor es sich homogen im Körperwasser verteilen kann. Damit entfällt die Voraussetzung für den Berechnungsmodus, der üblicherweise den radiospirometrischen Versuchen zugrunde gelegt wird. Die Folge davon ist die Vortäuschung einer überhöhten HTO-Bildung. Ein Vergleich der Hydroxylasen-Aktivität in männlichen Ratten und Meerschweinchen muß deshalb im Rahmen dieser Arbeit auf die in vitro Versuche beschränkt bleiben.

Obwohl auch in weiblichen Meerschweinchen 5 α -Dihydrotestosteron in der Lunge hydroxyliert wird (Tab. 14, Exp. II), zeigen diese Tiere nach Injektion von [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron bei der Radiospirometrie keine Besonderheiten. Dies war auch nicht zu erwarten, da die Metabolisierung in der Lunge ($\sigma^+ : \phi^- = 1.9$) wesentlich niedriger, in der Leber ($\sigma^+ : \phi^- = 0.38$) aber höher ist als bei Männchen. Demzufolge wird die HTO-Bildung in vivo bei Weibchen, da nicht soviel intaktes Substrat die Lunge passiert, im wesentlichen durch die Hydroxylierung in der Leber, bei Männchen aber, wo der Abbau in der Leber minimal ist, allein durch den Abbau in der Lunge bestimmt. Aus denselben Gründen wirkt sich wahrscheinlich auch bei Ratten die Enzymaktivität der Lunge auf die HTO-Bildung in vivo nicht so offensichtlich aus.

Bei weiblichen Ratten ist - bei etwa gleicher Dosis injiziertem Steroid/kg - die Menge an abgespaltenem Tritium 7 Std. p.i. um den Faktor 3 höher als bei weiblichen Meerschweinchen (vergleiche Abb. 12 und 13). Dies ist erstaunlich, da in vitro bei einer Substratkonzentration von 10^{-4} mol/l die absolute Hydroxylierungsrate in der Leber bei den beiden Tierspezies gleich und in der Lunge in Ratten sogar nur halb so groß ist wie in Meerschweinchen (Tab. 12 und 14).

Es müßte also in Meerschweinchen im Vergleich zu Ratten mehr HTO gebildet werden. Andererseits ist aber in Ratten die Aktivität der Nebenniere um den Faktor 1.5 größer. An diesem Beispiel wird deutlich, wie die Gesamt-Hydroxylierungsrate in vivo durch die Enzymaktivität der einzelnen Organe bestimmt wird.

5. Altersabhängigkeit (Kap. C.2.2.)

Außer von dem Geschlecht ist die Aktivität der 2 α -Hydroxylase abhängig vom Alter der Tiere. In Übereinstimmung mit Befunden von Schriefers (65, 132) erfolgt eine einschneidende sexuelle Differenzierung der Hydroxylase-Aktivität nicht vor dem 30. Lebenstag. Dies wird deutlich durch die in Tabelle 19 zusammengefaßten in vivo und in vitro Ergebnisse. Vergleicht man den Abbau bei infantilen männlichen und weiblichen Tieren, so ist die Hydroxylierungsrate in der Leber bei beiden Geschlechtern nahezu gleich, in vivo 7 Std. p.i. bei weiblichen Tieren etwas niedriger ($\sigma : \phi = 1.3$).

Wie erwartet nimmt bei männlichen Ratten die Enzymaktivität mit dem Alter zu. Dabei zeigt Testosteron sowohl in vivo (adult : infantil = 1.7) als auch in vitro (adult : infantil = 8.5) eine ausgeprägtere Entwicklung als 5 α -Dihydrotestosteron. Für dieses Substrat ist das Umsatz-Verhältnis von erwachsenen zu infantilen Ratten in vivo 1.4 und in vitro 3.2. Weibliche Tiere verhalten sich gänzlich anders. Bei ihnen nimmt die Enzymaktivität mit dem Alter nicht zu, sondern um ein Drittel ab (5 α -Dihydrotestosteron) oder bleibt gleich (Testosteron). Dabei zeigen in vivo und in vitro Ergebnisse eine gute Übereinstimmung. Für die altersbedingte Entwicklung der 2 α -Hydroxylase von 5 α -Dihydrotestosteron in weiblichen Ratten kann demnach ein ähnlicher Verlauf angenommen werden wie für die von Schriefers dargestellte 11 β -Steroid-Hydroxylase (65, Abb. 1b).

Die Angaben von Schriefers (65, Tab. 1), nach denen Testosteron in erwachsenen Männchen doppelt soviel hydroxyliert wird wie in infantilen, konnten wir für die 2 α -Hydroxylase in vivo bestätigen, in vitro fanden wir sogar den Faktor 8. Generell war die altersbedingte Differenzierung in vitro ausgeprägter als in vivo.

In Zusammenhang mit den bereits diskutierten biochemischen Eigenschaften (vergleiche Tab. 2 und 18 sowie S. 75) kann die unterschiedliche Entwicklung der Aktivitätsmuster ein Hinweis sein, daß es sich bei der 2 α -Hydroxylase von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron um verschiedene Enzymsysteme handelt (133).

6. Organspezifität (Kap. C.2.3.)

Ratten

In männlichen Ratten wird Testosteron an C-2 ausschließlich in der Leber abgebaut (Tab. 11). Da in den Erfolgsorganen - außer der 7 α -Hydroxylierung in der Testis (62, 63) - keine weiteren Abbaureaktionen bekannt sind, steht Testosteron in diesen Organen in vollem Umfang zur Umwandlung in das weitaus wirksamere Androgen 5 α -Dihydrotestosteron zur Verfügung.

Im Gegensatz dazu wird 5 α -Dihydrotestosteron nicht nur in der Leber, sondern auch in den Erfolgsorganen insbesondere in der Prostata hydroxyliert (Tab. 11, Exp. I: Leber/Prostata = 2.1). Dies ist ein Beitrag zu der oft diskutierten Frage nach Inaktivierung und Ausschleusung der grundsätzlich nur wenige Stunden wirksamen Hormone. Im allgemeinen wird eine Metabolisierung in Erfolgsorganen für unwahrscheinlich gehalten. Jensen (137, 138) zum Beispiel findet im Uterus keine Anzeichen für eine Östradiol-Oxidation.

In männlicher und weiblicher Nebenniere von Ratten ist die Hydroxylierung von 5 α -Dihydrotestosteron größer als in der Leber (Leber/Nebenniere = 0.73 (σ) bzw. 0.16 (ϕ)). Vorstellbar ist hier die Wirkung unspezifischer Hydroxylasen, die in der Nebenniere in erster Linie den Abbau von Corticoiden zur Aufgabe haben, von denen aber auch 5 α -Dihydrotestosteron angegriffen wird. Dies würde auch erklären, warum gerade in der Nebenniere für diese Reaktion keine Sexu- alspezifität nachzuweisen ist (σ : ϕ = 0,92). Eine biologische Bedeutung für den Androgenstoffwechsel ist unwahrscheinlich, besonders wenn man berücksichtigt, daß die in der Nebenniere gebildete Menge an Testosteron und damit auch die seines Folgeproduktes 5 α -Di-

hydrotestosteron sehr gering ist. Keine Erklärung haben wir dafür, daß nur 5 α -Dihydrotestosteron, nicht aber Testosteron in der Nebenniere hydroxyliert wird.

Die Hydroxylierung von 5 α -Dihydrotestosteron in der Lunge ist im Hinblick auf die endogen gebildeten Hormone wichtiger als in der Leber, da durch die Leber nur 30 % des aus dem Herzen kommenden Blutstroms fließt, durch die Lunge aber 100 % (102). In der Lunge gebildete Metabolite wirken sich daher auf den Hormonspiegel im Blut direkt aus, wodurch eine Rückkopplung auf die Regulation der Hormonwirkung denkbar ist. Auch in der Lunge ist eine sexuelle Differenzierung der 2 α -Hydroxylase-Aktivität nicht nachweisbar ($\sigma : \phi = 1.1$, vergleiche Tab. 11 und 12).

Meerschweinchen

Schon Untersuchungen über die 5 α -Reduktase haben gezeigt, daß männliche Meerschweinchen-Organen ein gänzlich anderes Enzymmuster zeigen als Organe von Ratten. Nicht in der Leber, sondern in der Nebenniere wurde die größte 5 α -Reduktase-Aktivität gemessen (18). Eine Parallele dazu fanden wir bei der 2 α -Hydroxylierung von 5 α -Dihydrotestosteron. Die Reaktion war in der männlichen Nebenniere 6mal und in der Lunge sogar 15mal größer als in der Leber (Tab. 13, Exp. II). Auch in der Nebenniere von Weibchen war eine 2 α -Hydroxylierung nachzuweisen. Ebenso wie bei Ratten kann man auch hier die Wirkung von Corticoid-Hydroxylasen vermuten. Für Cortisol ist eine 2 α -Hydroxylase in der Nebenniere von Meerschweinchen beschrieben (100).

Eine Hydroxylierung von Testosteron an C-2 konnten wir nicht in dem Maße nachweisen wie es Demisch und Mitarbeitern (57) für die 7 α - und 6 β -Hydroxylierung gelungen ist.

7. Durch welche Faktoren läßt sich die 2 α -Hydroxylierung hemmen ?
 (Kap. C.2.4. und C.2.5.)

Nahrungsentzug und Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff üben einen deutlich hemmenden Effekt auf die Hydroxylierung von Androgenen aus. Diese Inhibition kann verschiedene Ursachen haben.

Die hemmende Wirkung des Nahrungsentzugs soll zunächst als Folge eines geringeren Angebots an reduziertem Coenzym diskutiert werden. In Anlehnung an die Erklärung von Schriefers (116) für die Abnahme der Cortisonhydrierung scheint auch uns ein Mangel an NADPH ein wesentlicher Faktor für die verringerte Metabolisierung nach 60stündigem Hunger zu sein. Das würde erklären, warum besonders in vitro der Hemmeffekt bei Testosteron stärker auftritt als bei 5 α -Dihydrotestosteron. Der Metabolismus von Testosteron wird durch Nahrungsentzug zweifach gehemmt: einmal durch verminderte Hydrierung zum 5 α -Dihydrotestosteron und zum anderen durch Einschränkung der Hydroxylierung. Man kann annehmen, daß bei gesunden Tieren ein kleiner Teil des aus [1 α ,2 α -T]-Testosteron labilisierten Tritium in Wirklichkeit von dem sehr rasch gebildeten 5 α -Dihydrotestosteron stammt (vergleiche Kap. C.1.1.6.). Da bei Nahrungsentzug weniger 5 α -Dihydrotestosteron entsteht, wird die HTO-Bildung aus [1 α ,2 α -T]-Testosteron schon deshalb abnehmen, weil diese Sekundär-Reaktion wegfällt. Es ist daher verständlich, daß für Testosteron in vitro ein um den Faktor 2 größerer Hemmeffekt gemessen wird als für 5 α -Dihydrotestosteron (vergleiche Tab. 16 und 17). In diesem Zusammenhang muß außerdem auf die unterschiedliche Coenzymspezifität der Steroid-Hydroxylierung hingewiesen werden (vergleiche Tab. 2). 5 α -Dihydrotestosteron kann im Gegensatz zu Testosteron nicht nur in Gegenwart von NADPH hydroxyliert werden, sondern auch NADH kann als Coenzym fungieren.

Im Widerspruch zu dieser Theorie stehen allerdings neuere Angaben von Williams und Mitarbeitern (139), denen zufolge die Menge an reduzierten Pyridinnucleotiden in Rattenleber-Zellen nach einer Hungerperiode von 48 Std. nicht sinkt. Nehmen wir diesen Befund als Grundlage für unsere

Überlegungen, so ist die verminderte Hydroxylierung durch Nahrungsmangel eher auf die Einschränkung der Protein-Synthese als auf Coenzymmangel zurückzuführen. Diese offenen gebliebene Frage läßt sich eventuell durch Inkubation mit zellfreien Leberpräparationen unter Variation des Coenzymzusatzes klären.

Die Hemmung der Hydroxylierung nach Vorbehandlung mit Tetrachlorkohlenstoff kann ebenfalls verschiedene Ursachen haben. Außer einer verminderten Protein-Biosynthese (108) und der Zerstörung von Cytochrom P-450 (110, 125) spielt die verminderte Biosynthese von oxidierten und reduzierten Pyridinnucleotiden eine Rolle (146). Der NADPH-Spiegel sinkt nach Schädigung der Leber mit Tetrachlorkohlenstoff (147).

Die Ursache für die Hemmung der Steroid-Hydroxylierung ist für die biologische Bedeutung dieses Effekts ohne Belang. Ist der Abbau von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron durch die oben besprochenen Faktoren inhibiert, so wird eine Verlängerung der biologischen Halbwertszeit der Steroide die Folge sein. Durch den Anstieg der Konzentration von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron nicht nur in der Leber, sondern auch im Plasma sowie in anderen Organen können die androgenen Effekte sowie die hormonelle Regulation beeinflußt werden. Man kann annehmen, daß davon nicht nur der Stoffwechsel der Androgene, sondern auch der von Östrogenen betroffen ist. Nach Untersuchungen von Wenzel und Mitarbeitern (140/Abb. 3) wird der E_2/E_1 -Quotient in männlicher und weiblicher Rattenleber durch Androgene beeinflußt. Schon eine relativ geringfügige Zunahme der Testosteron-Konzentration führt zu einem erheblich erhöhten E_2/E_1 -Quotienten. Ein Anstieg der Östradiol-Konzentration in der Leber kann - wenn das Steroid mit dem Blut in die Erfolgsorgane transportiert wird - endokrinologische Effekte verursachen.

Wie schon früher für andere Steroid-Hydroxylierungen (85) konnten wir auch für die 2 α -Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron eine Inhibition durch Metopiron und Cyproteronacetat nachweisen. Offen blieb die Frage, warum beide Hemmstoffe in vivo

um das 2 - 3fache effektiver waren als in vitro (Abb. 16 und 17 sowie Tab. 15).

Falls in der Leber verschiedene Steroid-Hydroxylasen wirken (141, 142), diese aber nicht alle gleich stark durch Cyproteronacetat hemmbar sind, so ist ein durch das Anti-Androgen verursachter hemmender Effekt ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal für Hydroxylasen. Die Hemmung der 2 α -Hydroxylase entspricht Befunden, nach denen nur die Aktivität geschlechtsspezifischer Enzyme durch Cyproteronacetat inhibiert werden kann. Eine Hemmung der sexuell indifferenten 7 α -Hydroxylase konnte dagegen nicht nachgewiesen werden (143).

Nach Erkenntnissen verschiedener Autoren (74, 144, 145) beruht der Wirkungsmechanismus von Cyproteronacetat prinzipiell auf einer kompetitiven Hemmung von Rezeptoren. In diesem Zusammenhang wird durch unsere Ergebnisse die Vermutung von Schriefers (143) bestätigt, daß nicht nur in den Sexualorganen, sondern auch in der Leber Rezeptoren für den Androgen-Stoffwechsel eine Rolle spielen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Bisher wurde der Abbau von Androgenen in vivo und in vitro durch Identifizierung der Metabolite nach ihrer Extraktion entweder aus dem entsprechenden Gewebe oder aus Kot und Harn qualitativ nachgewiesen. Wegen der aufwendigen und langwierigen Aufarbeitung waren quantitative Angaben sehr spärlich. In der vorliegenden Arbeit wurde ein methodisch einfaches Verfahren, die "stoffwechsellabile Tritium-Markierung", zum Nachweis von Hydroxylierungsreaktionen bei Androgenen erprobt. Diese Methode ermöglichte erstmals quantitative Aussagen über die 2 α -Hydroxylierung von Testosteron und 5 α -Dihydrotestosteron in vivo und in vitro.

Die Tritium-Abspaltung aus [1 α ,2 α -T]-Testosteron und [1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron verlief proportional zur Gewebemenge und Inkubationsdauer. Damit war nachgewiesen, daß die HTO-Bildung ein Maß für die 2 α -Hydroxylierung war. Im Rahmen der weiteren Beweisführung konnte nach Inkubation von Testosteron mit Rattenlebermikrosomen auch inaktives 2 α -OH-Testosteron zum erstenmal massenspektrometrisch und gaschromatographisch nachgewiesen werden.

Für die 2 α -Hydroxylierung in männlicher Rattenleber wurden folgende biochemische Charakteristika ermittelt: Lokalisation der Hydroxylasen in der Mikrosomenfraktion, NADPH und (oder) NADH-Abhängigkeit, K_m -Werte und Hemmbarkeit durch Kaliumcyanid, Metopiron und Cyproteronacetat.

In vivo Untersuchungen der 2 α -Hydroxylierung in Ratten durch Radio-spirometrie (HTO-Analyse nach Gabe Tritium-markierter Substrate) ergaben die für Sexualhormone typische geschlechts- und altersabhängige Entwicklung der Enzymaktivität. Diese in vivo Befunde konnten durch in vitro Versuche mit Rattenleber bestätigt werden.

Während Testosteron ausschließlich in der Leber metabolisiert wurde, ließen sich für 5 α -Dihydrotestosteron auch in der Nebenniere, Niere, Lunge sowie Prostata und Testis nennenswerte Abbauraten nachweisen. In der Nebenniere und Lunge war die Hydroxylierung nicht ge-

schlechtsspezifisch.

Hunger und Schädigung der Leber durch Tetrachlorkohlenstoff beeinträchtigten die Hydroxylierung in vivo und in vitro.

Die Organe von Meerschweinchen waren mit einem gänzlich anderen Enzymmuster ausgestattet als Rattenorgane. Nicht in der Leber, sondern in der Nebenniere und in der Lunge wurde der Hauptteil von 5α -Dihydrotestosteron an C-2 hydroxyliert. Auch die Sexualspezifität des Abbaus war eine andere als bei Ratten. Weibliche Meerschweinchen zeigten in der Leber und Nebenniere eine höhere, in der Lunge eine niedrigere Enzymaktivität als Männchen. Testosteron wurde in Meerschweinchen nur in unbedeutenden Mengen abgebaut.

Die Untersuchungen von 5α -Dihydrotestosteron beschränkten sich nicht auf die enzymatische Reaktion an C-2, sondern wurden auf C-5 ausgedehnt. Das Substrat wurde von uns auf biochemischem Wege stereospezifisch mit Tritium in Position 5 markiert. Mit [5α -T]-Dihydrotestosteron konnte in Rattenorganen eine enzymatisch bedingte HTO-Abspaltung nachgewiesen werden, die auf eine Dehydrierung zum Testosteron zurückgeführt wurde.

F. MATERIAL UND METHODIK

Substanzen

Alle Substanzen und Reagenzien wiesen p.a. Qualität auf. Soweit notwendig wurden die Substanzen zusätzlich chromatographisch gereinigt oder umkristallisiert. Die verwendeten Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert und unter Lichtschutz aufbewahrt.

Enzyme und Coenzyme waren Produkte der Fa. Boehringer, Mannheim.

Inaktive Steroide stammten von den Firmen E. Merck, Darmstadt oder Schering AG, Berlin. 2 α - und 2 β -OH-Testosteron erhielten wir aus der Steroid Reference Collection, Hampstead.

Die radioaktiven Substanzen waren mit Ausnahme von [5 α -T]-Dihydrotestosteron Handelspräparate der Fa. Amersham/Buchler und hatten folgende spezifische Radioaktivitäten:

[1 α ,2 α -T]-Testosteron	49	Ci/mmol
[1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron	47	Ci/mmol
[5 α -T]-Dihydrotestosteron	0.5	Ci/mmol
[4- ¹⁴ C]-Testosteron	59.4	mCi/mmol
[1-T]-Glucose	5.3	Ci/mmol

Vor der Verwendung der radioaktiven Substanzen erfolgte eine chromatographische Reinheitskontrolle. Außerdem wurde die spezifische Radioaktivität durch Zugabe von inaktivem Trägermaterial um den Faktor 10² bis 10⁴ gesenkt.

Aktivität im Inkubationsansatz:

(unabhängig von der Substratkonzentration)

[1 α ,2 α -T]-Testosteron	0.1 - 0.3	μ Ci/ml
[1 α ,2 α -T]-5 α -Dihydrotestosteron	0.1 - 0.3	μ Ci/ml
[5 α -T]-Dihydrotestosteron	1.0 - 1.5	μ Ci/1.5 ml

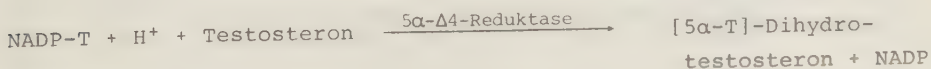
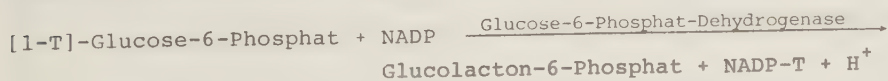
Enzymatische Synthese von [5 α -T]-Dihydrotestosteron

Im Testosteron, einem α, β -ungesättigten Keton, hat die unterschiedliche Elektronenaffinität von Sauerstoff und Kohlenstoff eine Polarisierung der Carbonylgruppe zur Folge. Dementsprechend lassen sich nach Ringold und Mitarbeitern (111) folgende Grenzstrukturen formulieren:



Daraus ergibt sich für die Hydrierung von Testosteron durch die 5 α -Reduktase und NADPH ein bestimmter Reaktionsmechanismus: Das vom NADPH stammende Hydridion H^- lagert sich am C-5, ein Proton am C-4 an (112 - 115). Läßt man die Reaktion in Tritium-Wasser ablaufen oder setzt NADPT als Coenzym ein, so kann Tritium als T^+ in 4- oder als T^- in 5-Stellung in das Steroid eingebaut werden.

Bei der Darstellung von [5 α -T]-Dihydrotestosteron dienten Lebermikrosomen weiblicher Ratten als Enzymquelle, da diese nach Untersuchungen von Schriefers und Mitarbeitern (46) fast ausschließlich 5 α - und kaum 5 β -Reduktase enthalten. Das benötigte Coenzym wurde mit [1-T]-Glucose als Tritium-Donator in einem NADPH bzw. NADP-T generierenden System radioaktiv markiert (116 - 117). Es ergibt sich folgende Reaktionskette:



Inkubationsansatz (118): 1.0 ml Mikrosomensuspension $\hat{=}$ 200 mg Leber
 2.0 ml TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) mit
 ATP 1.2 μmol
 NADP 0.8 μmol
 MgCl_2 10 μmol
 0.5 ml [1-T]-Glucose 0.1 μmol = 530 μCi
 0.1 ml Glucose 0.7 μmol
 0.1 ml Hexokinase 19 μmol
 0.1 ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase 5 μg
 0.1 ml Testosteron-Lösung mit 1 μmol in
 Äthanol

Nach der Inkubation (15 Min. bei 37°C) wurden die Steroide 4mal mit 3 ml Dichlormethan ausgeschüttelt und dünnschichtchromatographisch in Chloroform/Aceton 9 : 1 (Laufzeit 3 Std.) aufgetrennt. Das Radiochromatogramm (Abb. 20) zeigt, daß außer [5 α -T]-Dihydrotestosteron (R_F = 0.78)* in geringer Ausbeute noch zwei weitere radioaktive Verbindungen, nämlich 3 α ,17 β -Androstandiol (R_F = 0.54)* und 5 α -Androstandion (R_F = 1.0)* gebildet wurden.

Die radiochromatographische Reinheit des synthetisierten [5 α -T]-Dihydrotestosteron wurde bewiesen durch Rechromatographie in Chloroform/Tetrahydrofuran 96 : 1 (R_F = 0.38) und in Äther/Dimethylformamid 99 : 1 (R_F = 0.41). Die R_F -Werte waren mit denen von authentischem 5 α -Dihydrotestosteron identisch (Abb. 20).

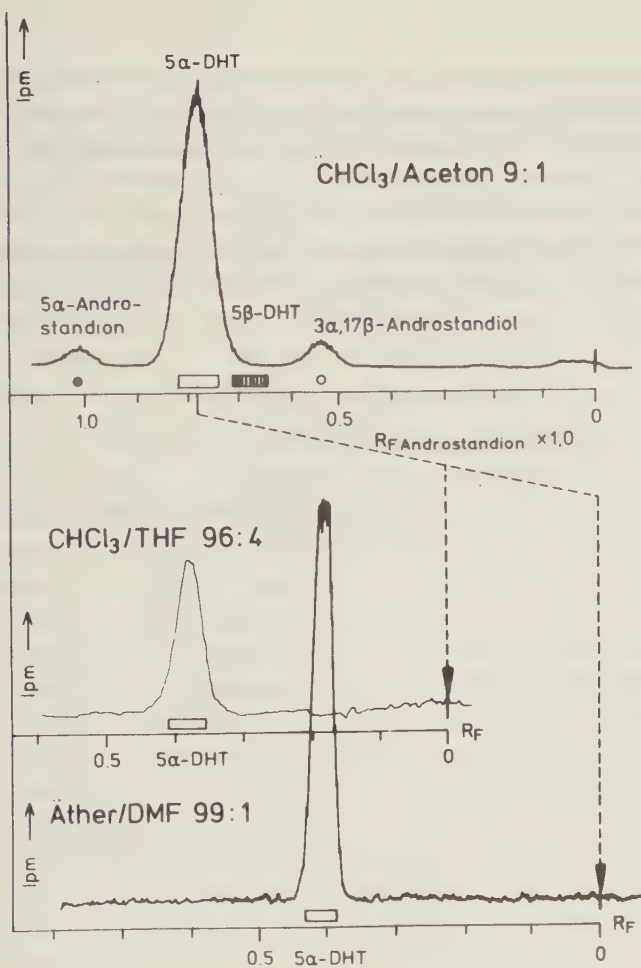
Die radiochemische Reinheit wurde folgendermaßen überprüft: Eine Probe des radioaktiven Materials wurde mit 100 mg inaktivem 5 α -Dihydrotestosteron verdünnt und in verschiedenen Lösungsmitteln umkristallisiert. Dabei blieb die spezifische Aktivität (Zpm/mg), die nach jeder Umkristallisation erneut bestimmt wurde, konstant. Somit konnte [5 α -T]-Dihydrotestosteron als radiochemisch rein bezeichnet werden.

* R_F -Werte bezogen auf 5 α -Androstandion (R_F = 1.00)

ABB. 20: DC-REINIGUNG VON [5 α -T]-DHT

Ca. 100 μ Ci entsprechend 60y [5 α -T]-DHT wurden auf eine DC-Platte in einer Bahn von 2.5 cm Breite aufgetragen. Die in Höhe der inaktiven Referenzsubstanz auftretende Aktivität wurde eluiert und die radiochromatographische Reinheit in zwei verschiedenen Fließmitteln nachgewiesen.

Inkubationsansatz: siehe Seite 92



TAB. 20: UMKRISTALLISATION VON $[5\alpha\text{-T}]\text{-DIHYDROTESTOSTERON}$

spez. Akt. (Zpm/mg)		Lösungsmittel
1.	1473	Essigester
2.	1618	Essigester
3.	1581	Essigester
4.	1534	Isopropanol
5.	1552	Isopropanol

Zur Kontrolle der spezifischen Markierung des Moleküls mit Tritium in Position 5 wurde das synthetisierte $[5\alpha\text{-T}]\text{-Dihydrotestosteron}$ nach der Methode von Abul-Hajj (88) enolisiert. Sinn der Enolisierung war es, eventuell am Kohlenstoff 4 eingebautes Tritium zu entfernen und als HTO nachzuweisen. Es konnten aber nach Enolisierung nur 0.4 % der eingesetzten Aktivität als HTO bestimmt werden. Dies spricht eindeutig gegen einen Tritium-Einbau an C-4, zumal das in so geringfügiger Menge abgespaltene Tritium vom C-5 stammen kann.

TAB. 21: SYNTHESE VON $[5\alpha\text{-T}]\text{-DIHYDROTESTOSTERON}$

n	[1-T]-Glucose	$[5\alpha\text{-T}]\text{-Dihydrotestosteron}$		
	$\mu\text{Ci}/\text{Ans.}$	$\mu\text{Ci}/\text{Ans.}$	%d.eing.Akt.	spez.Akt. ($\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$)
1	525	86	16.4	656
1	469	125	26.6	595
2	589 ± 22	124 ± 13	21.3 ± 3	692 ± 25
4	492 ± 7.8	119 ± 33	19.2 ± 5.4	620 ± 8.6
4	624 ± 24	99 ± 19.6	15.8 ± 2.8	763 ± 24.2
4	406 ± 33	135 ± 7.8	33.4 ± 4.2	500 ± 52.3

Tab. 21 gibt eine Übersicht über Ausbeuten und spezifische Aktivitäten des synthetisierten [5 α -T]-Dihydrotestosteron. Es fällt auf, daß die Ausbeuten an [5 α -T]-Dihydrotestosteron zwischen 15 - 30 % der eingesetzten Aktivität schwanken. Die Ursache dafür konnte nicht geklärt werden. Die verschiedenen spezifischen Aktivitäten von [5 α -T]-Dihydrotestosteron ergaben sich deshalb, weil unterschiedliche Mengen an [1-T]-Glucose eingesetzt wurden, während die Menge an inaktiver Glucose konstant 0.7 μ mol pro Ansatz betrug.

Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Wistar-Ratten der Fa. Hagemann, Börsingfeld/Hannover. Die erwachsenen Ratten hatten ein mittleres Gewicht von 200 g, die infantilen Ratten wogen 30 - 40 g und waren 18 - 21 Tage alt.

Die männlichen und weiblichen Meerschweinchen wurden im Tierhandel bezogen und hatten ein Gewicht von 600 - 800 g.

Die Tiere erhielten ein Standardfutter (Altromin R) und Trinkwasser nach Bedarf.

Puffer

Gewebeschnitte: 105 Teile Krebs-Ringer-Lösung (0.154 M) + 20 Teile Phosphat-Puffer (0.1 M) pH 7.4 (119)

Gewebehomogenat und -fraktionen: TRIS-HCl-Puffer (0.05 M) pH 7.4 (120)

Nierencytoplasma: TRIS-HCl-Puffer pH 8.6

Das Gewebe wurde in diesem Puffer homogenisiert und fraktioniert. Falls notwendig wurde die gewonnene Cytoplasmafraktion mit 0.1 N-NaOH oder 0.1 N-HCl auf pH 8.6 eingestellt.

Injektionslösungen

Die Substanzen wurden in 90 % Äthanol gelöst und zur besseren Verträglichkeit mit 0.9 % NaCl 1 : 1 gemischt. Auf eine Sterilisation wurde verzichtet.

Gewebeinkubationen

Die Tiere wurden entweder durch Genickschlag oder nach Narkotisieren mit Äther durch Herzschnitt getötet und die entnommenen Organe sofort in die entsprechende eiskalte Pufferlösung gelegt.

Die Zeit zwischen dem Exitus der Tiere und dem Inkubationsbeginn betrug nicht mehr als 15 Minuten.

Organschnitte

Die Organe wurden von Fett und anhaftendem Gewebe befreit und auf einen mit Filterpapier bedeckten Eisblock gebracht. Flach ziehend mit der Rasierklinge wurden 0.3 - 0.5 mm dünne Schnitte angefertigt und sofort in eiskalten Krebs-Ringer- PO_4 -Puffer (pH 7.4) überführt.

Ovar, Prostata, Samenblase und Uterus, der Länge nach gespalten, wurden mit der Schere zerkleinert.

Gewebehomogenat

Eine entsprechende Menge an kleingeschnittenem Gewebe wurde in TRIS-HCl-Puffer (pH 7.4) unter Eiskühlung homogenisiert: Lebergewebe mit einem Potter Elvehjem Homogenisator bei 400 U/min, Nierengewebe mit einem Atomixmill bei 1 000 U/min.

Zellfraktionen

Die Herstellung der morphologischen Zellfraktionen erfolgte in einer Beckmann Spinco Ultrazentrifuge mit Festwinkel-Rotor Typ Titan 50.

Das Gewbehomogenat wurde 15 Min. bei 10 000 x g entsprechend 13 000 U/min zentrifugiert. Das aus Zellkernen und Mitochondrien bestehende Zentrifugat wurde verworfen. Der Überstand wurde erneut 60 Minuten bei 105 000 x g entsprechend 41 000 U/min zentrifugiert. Das vom Überstand abgetrennte Sediment wurde als Mikrosomenfraktion bezeichnet. Zur Reinigung wurden die Mikrosomen 3mal in 5 ml Puffer suspendiert und 45 Minuten bei 41 000 U/min zentrifugiert.

Zur Inkubation wurde die Fraktion in einer entsprechenden Menge Puffer suspendiert und homogenisiert.

Der nach Abtrennung der Mikrosomen verbleibende Überstand stellte die Cytoplasmafraktion des Gewebes dar.

Inkubationsansätze

Ein Inkubationsansatz bestand aus Gewebeschnitten bzw. -homogenat oder einer Zellfraktion als Enzymquelle, dem Steroid (10^{-4} - 10^{-5} mol/l) und eventuell aus Zusätzen wie Coenzyme oder Inhibitoren. Meistens enthielt ein Ansatz 1 ml Puffer und 50 mg Gewebe. Die Steroide wurden entweder - gelöst in 0.1 ml 90 % Äthanol/H₂O 1 : 2 - dazu pipettiert oder wurden ebenso wie Coenzyme und Inhibitoren der für den Versuch insgesamt bereiteten Puffermenge zugemischt.

Die Inkubation wurde gestartet durch Einbringen des Ansatzes in den auf 37°C temperierten Warburg Schüttelthermostaten. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 10 Minuten.

Bei anaeroben Inkubationen wurden die Steroide in 0.1 ml Propylen-glykol/H₂O 1 : 2 gelöst. Durch Begasung mit Stickstoff (95 % N₂ + 5 % CO₂) während einer Vorinkubation von 10 Min. bei 37°C wurde eine sauerstofffreie Atmosphäre geschaffen. Durch Zugabe des Steroids aus dem Seitenarm des Inkubationsgefäßes wurde die Reaktion gestartet.

Inkubationsstop erfolgte durch Einbringen der Inkubationsgefäße in Eis und Zugabe von Chloroform oder Dichlormethan.

Bei allen Versuchen wurden mindestens zwei Ansätze, die außer Gewebe alle Komponenten enthielten, zur Kontrolle mit inkubiert und aufgearbeitet.

Aufarbeitung der Inkubationsansätze

Extraktion

Zur Extraktion der Steroide wurden die Inkubationsansätze 4mal mit 3 ml Chloroform oder Dichlormethan ausgeschüttelt. Zur Vermeidung von Zersetzung wurde sowohl dem Puffer als auch dem organischen Extrakt Ascorbinsäure (10 mg/ml) zugesetzt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und im Wasserbad bei 40°C im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft.

Dünnschichtchromatographie

Der zur Trockne eingedampfte Gewebeextrakt wurde mehrmals in Aceton aufgenommen und quantitativ mit einer Kapillare in Bahnen von 2.5 cm Breite auf eine DC-Platte der Fa. Merck (Kieselgel F 254, 0.25 mm Schichtdicke) aufgetragen. Es wurde aufsteigend in folgenden Fließmitteln chromatographiert (Angabe in Volumen-Teilen):

System A: Äther/Dimethylformamid	99 : 1
System B: Chloroform/Aceton	9 : 1
System C: Cyclohexan/Essigester	6 : 4
System D: Chloroform/Tetrahydrofuran	96 : 4

Inaktive Steroide dienten als Referenzsubstanzen und wurden entweder direkt im UV-Licht bei 254 nm oder nach Ansprühen mit Primulin-Lösung (121) bei 350 nm sichtbar gemacht.

Die Lage der radioaktiven Steroide wurde durch direkte Aktivitätsmessung mit einem Dünnschicht-Scanner der Fa. Berthold, kombiniert mit Autochronschreiber, ermittelt (122). Die quantitative Auswertung erfolgte durch Planimetrie oder mit Hilfe von Integrationskurven. Die Zählausbeuten des Scanners lagen bei einem Abstand von 0.5 mm (Oberfläche DC-Platte / Zählrohr) für Tritium bei 0.8 % und für ^{14}C bei 15 %, bei Verwendung einer Blende mit Fenster bei 9 %.

Die Wiederfindung der Steroide aus biologischem Material betrug 80 - 85 %.

Flüssig-Szintillationsmessung

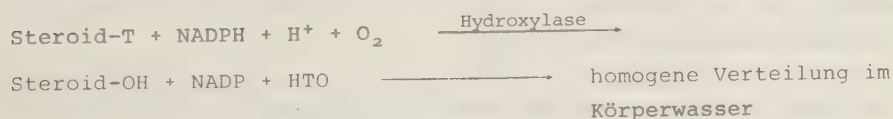
Radioaktive Lösungen, wäßrige Proben und von der Platte abgeschabte Kieselgelbanden wurden im Beckmann LS 150 Flüssig-Szintillationszähler gemessen (Szintillationslösung: Unisolve 1, Fa. Zinsser). Die Zählhausbeute wurde mit einem externen Standard, bei Kieselgelproben - wegen der Unzuverlässigkeit der externen Standardisierung - mit einem internen Standard ermittelt.

HTO-Bestimmung

Die Inkubationsansätze wurden, wenn auf die Trennung der Metabolite verzichtet werden konnte, direkt der Gefrierdestillation unterworfen: In einem von zwei - durch Hahnteil und Schliff miteinander verbundenen - Reagenzgläsern wurde die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Evakuierung des Systems wurde das leere Röhrchen in flüssigen Stickstoff getaucht und diente als Vorlage für das kondensierte Wasser. Die Menge des kondensierten HTO wurde im Flüssig-Szintillationszähler gemessen.

Radiospirometrie

Diese Methode beruht auf der "stoffwechsellabilen" Markierung der Steroide mit Tritium und der Bestimmung von Umsatzquoten im Organismus durch Tritiumaktivitätsmessung im Atemwasser (80).



Versuchsanordnung: Die entsprechende Menge Steroid wurde den Tieren i.p. injiziert. Je zwei erwachsene bzw. fünf infantile Tiere wurden danach sofort in einen speziellen Kunststoffzylinder gesetzt, dem mit Schwefelsäure und Calciumchlorid getrocknete Luft zugeführt wurde. Die in der Atemluft der Tiere enthaltene Feuchtigkeit wurde in einer angeschlossenen Kühlfalle ausgefroren. Die Kühlfallen wurden in bestimmten Zeitabständen gewechselt. Aus den Wasserproben wurde direkt die spezifische Aktivität in $\mu\text{Ci/g H}_2\text{O}$ bestimmt.

Aus dem Gewicht der Tiere läßt sich das Gesamtkörperwasser berechnen. Es beträgt 64 - 68 % des Gewichts der Tiere (123). Kennt man die injizierte Aktivitätsmenge, so läßt sich der Umsatz des Steroids nach folgender Formel errechnen:

$$\% \text{ Mindesthydroxylierung} = \frac{\mu\text{Ci} / \text{ml Körperwasserdestillat}}{\mu\text{Ci inj. Steroid} / \text{ml Körperwasser}} \times 100$$

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Substraten ist zu berücksichtigen, daß an der HTO-Bildung nur eines der beiden im $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]$ -Testosteron bzw. $[1\alpha, 2\alpha\text{-T}]\text{-}5\alpha\text{-Dihydrotestosteron}$ befindlichen T-Atome beteiligt ist, d.h. $\% \text{ HTO} \times 2 = \% \text{ Hydroxylierung}$ (siehe auch S. 11).

Isolierung und Nachweis von inaktivem 2 α -Hydroxy-Testosteron

Für alle Arbeitsgänge wurden ausschließlich Lösungsmittel mit Uvasol-Qualität der Fa. Merck benutzt. Vor Gebrauch wurden sie zur zusätzlichen Reinigung über eine Vigreux-Kolonne destilliert.

Die DC-Platten (Fa. Merck, Kieselgel F 254, 0.25 mm Schichtdicke) wurden 5mal mit Methanol (Uvasol) vorgewaschen und vor Gebrauch aktiviert (15 Minuten auf 110°C).

Sämtliche verwendeten Gefäße wurden mit Perhydrol/Schwefelsäure 1 : 1 gesäubert und staubfrei aufbewahrt (124).

Inkubationsansatz: 90 ml Mikrosomensuspension entsprechend 5 g Lebergewebe ♂

9 ml H₂O/Äthanol (2 : 1) mit

Testosteron 10⁻⁴ mol/l

NADPH 5 · 10⁻⁴ mol/l

Inkubationsbedingungen: 15 Minuten bei 37°C unter O₂-Begasung im Warburg Schüttelthermostaten

Extraktion: Nach Zugabe von 1 g Ascorbinsäure zum Inkubationsansatz wurde mit 70 ml Äther (Uvasol) im Halbmikroperforator nach Kutscher-Steudel 10 Stunden extrahiert.

Dünnschichtchromatographie: Der im Stickstoffstrom zur Trockne eingedampfte Extrakt wurde in Aceton aufgenommen, in einer schmalen Bande über die gesamte Breite einer DC-Platte quantitativ aufgetragen und anschließend durch Mehrfach-Chromatographie getrennt.

Entwicklung in: System A (3 x je 18 cm Laufstrecke) anschließend
Rechromatographie in: System B (4 x je 18 cm Laufstrecke) und
System C (4 x je 18 cm Laufstrecke)

Die Substanz wurde jeweils mit 4 x 2 ml Äther in einer G 4 Mikrofritte unter Ausschluß von Luft eluiert.

Massenspektrometrie und Gaschromatographie

Massenspektrum und Gaschromatogramm mußten getrennt voneinander aufgenommen werden, da für eine Kopplung kein geeignetes Gerät zur Verfügung stand. Aus diesem Grund war der gesamte Isolierungsgang sehr schwierig und aufwendig, da von einer so minimalen, aus biologischem Material isolierten Substanzmenge nur dann ein brauchbares Spektrum aufgenommen werden konnte, wenn jede auch noch so geringfügige Verunreinigung vermieden wurde.

Massenspektrometer: CH 7 Varian MAT

Gaschromatograph : Hewlett Packard 5750

Methyloximbildung und Silylierung

Zu dem trockenen Extrakt wurden 0.2 ml einer Lösung von 14 mg O-Methylhydroxylaminhydrochlorid in 1.0 ml Pyridin gegeben und die Mischung 24 Std. lichtgeschützt bei Raumtemperatur stengelassen (50). Dann wurden 0.1 ml Hexamethyldisilazan und 0.05 ml Trimethylchlorsilan zugefügt und das Gemisch nochmals 24 Std. lichtgeschützt bei Raumtemperatur stengelassen (57). Nachdem das überschüssige Lö-

sungsmittel im Stickstoffstrom abgeblasen worden war, wurde der Rückstand in 10 μ l Hexan aufgenommen. 1 μ l dieser Lösung wurde in den Gaschromatographen eingespritzt.

Glassäule : 6 ft x 1/4 inch, SE-30 1.5 % auf Chromosorb
(W-AW), 80 - 100 mesh

Trägergas (N_2) : 40 ml/min

Säulentemperatur: 210°C

Einspritzblock : 300°C

Detektor : 300°C

Bereich : 10 Dämpfung : 4

Papiervorschub : 0.25 inch/min

Frau B. Brüggener und Frau I.-H. Nipper bin ich für ihre praktische Hilfe dankbar.

Herrn J. Lindemann danke ich für die Aufnahme und Diskussion der Massenspektren und Gaschromatogramme.

G. LITERATUR

1. McGuire, J.S., Tomkins, G.M. Arch.Biochem.Biophys.
82 (1959) 476
2. McGuire, J.S., Tomkins, G.M. J.Biol.Chem.
235 (1960) 1634
3. McGuire, J.S., Tomkins, G.M. J.Biol.Chem.
234 (1959) 791
4. Tomkins, G.M. J.Biol.Chem.
225 (1957) 13
5. McGuire, J.S., Hollis, V.W.
Tomkins, G.M. J.Biol.Chem.
235 (1960) 11
6. Dorrington, J.H., Fritz, I.B. Biochem.Biophys.Res.Commun.
54 (1973) 1425
7. Verhoeven, G., De Moor, P. Endocrinology
89 (1971) 842
8. Arimisa, N., Kochakian, C.D. Endocrinology
92 (1973) 72
9. Stylianou, M., Forchielli, E.,
Dorfman, R.I. J.Biol.Chem.
236 (1961) 1318
10. Voigt, W., Fernandez, E.P.,
Hsia, S.L. J.Biol.Chem.
245 (1970) 5594
11. Hodgins, M.B., Hay, J.B. Steroids
21 (1973) 307
12. Buric, L., Becker, H.,
Petersen, C., Voigt, K.D. Acta Endocr.
69 (1972) 153
13. Stahl, F., Poppe, L.,
Dörner, G. Acta Biol.Med.Ger.
26 (1971) 855
14. Kniewald, Z., Massa, R.,
Marrini, L. in "Hormonal Steroids"
Herausgeber V.H.T.James
und L.Martini
Excerpta Medica Foundation,
Amsterdam (1971) 784
15. Massa, R., Stupnicka, E.,
Kniewald, Z., Martini, L. J.Steroid Biochem.
3 (1972) 385
16. Rommerts, F.F. G.,
Van der Molen, H.J. Biochim.Biophys.Acta
248 (1971) 489
17. Jaffe, R.B. Steroids
14 (1969) 483
18. Brown-Grant, K., Forchielli, E.,
Dorfman, R.I. J.Biol.Chem.
235 (1960) 1317
19. Bruchovsky, N., Wilson, D.J. J.Biol.Chem.
243 (1968) 2012

20. Frederiksen, D.W., Wilson, J.D. J.Biol.Chem.
246 (1971) 2584
21. Nozu, K., Tamaoki, B. Acta Endocr.
76 (1974) 608
22. Davies, P., Fahmy, A.R., Biochem.J.
129 (1972) 1167
23. Anderson, K.M., Cohn, H., Samuels, S. FEBS Letters
27 (1972) 149
24. Verhoeven, G., De Moor, P. Gynec.Invest.
2 (1971/72) 290
25. Saunders, F.J. Nat.Canc.Inst.Monogr.
12 (1963) 139
26. Dorfman, R.I., Shipley, R.A. Androgens; Biochemistry,
Physiology and Clinical
Significance,
J.Wiley & Sons, Inc.,
New York (1956) 118
27. Hilgar, A.G., Hummel, D.J. in "Androgenic and
Myogenic Endocrine
Bioassay Data", Part III
Herausgeber Vollmer, E.P.
Bethesda (1964) 15
28. Acevedo, H.F., Goldzieher, J.W. Biochim.Biophys. Acta
82 (1964) 118
29. Acevedo, H.F., Goldzieher, J.W. Biochim.Biophys.Acta
97 (1956) 564
30. Chamberlain, J., Jagarinec, N., Ofner, P. Biochem.J.
99 (1966a) 610
31. Siiteri, P.K., Wilson, J.D. J.Clin.Invest.
49 (1970) 1737
32. Giorgi, E.P., Stewart, J.C., Grant, J.K., Scott, R. Biochem.J.
123 (1971) 41
33. Morfin, R.F., Aliapoulos, M.A., Bennett, A.H., Harrison, J.H. Exc.Med.Int.Congr.Ser.
219 (1971) 337
Ofner, P.
34. Levy, H.R., Talalay, P. J.Biol.Chem.
234 (1959) 2009
35. Levy, H.R., Talalay, P. J.Biol.Chem.
234 (1959) 2014
36. Schubert, K., Böhme, K.-H., Kühn, Ch. Monatsberichte DAW
34 (1959) 517
37. Arimasa, N., Kochakian, C.D. Steroids
19 (1972) 325
38. Chamberlain, J., Jagarinec, N. Steroids
2 (1965) 1
Ofner, P.

39. Ullrich, V. Angew.Chem.
84 (1972) 689
40. Sih, Ch.J., Tsong, Y.Y.,
Stein, B. J.Amer.Chem.Soc.
90 (1968) 5300
41. Omura, T., Sanders, E.,
Estabrook, R.W., Cooper, D.Y.,
Rosenthal, O. Arch.Biochem.Biophys.
117 (1966) 660
42. Nakamura, Y., Ostuka, H.,
Tamaoki, B.-I. Biochim.Biophys.Acta
122 (1966) 34
43. Greim, H. Dtsch.Med.Wschr.
95 (1970) 2196
44. Kuntzmann, R., Jacobson, M.,
Schneidmann, K., Conney, A.H. J.Pharmacolog.Exp.Ther.
146 (1964) 280
45. Conney, A.H. Pharmacol.Rev.
19 (1967) 317
46. Schrievers, H., Cremer, W.,
Otto, M. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
348 (1967) 183
47. Leybold, K., Staudinger, H.J. Biochem.Z.
331 (1959) 389
48. Albaum, G., Staib, W. Biochem.Z.
342 (1965) 120
49. Berg, A., Gustafsson, J.-A. J.Biol.Chem.
48 (1973) 6559
50. Lisboa, B.P., Gustafsson, J.-A.,
Sjövall, J. Eur.J.Biochem.
4 (1968) 496
51. Gustafsson, J.-A., Lisboa, B.P.,
Sjövall, J. Eur.J.Biochem.
5 (1968) 437
52. Gustafsson, J.-A., Lisboa, B.P., Eur.J.Biochem.
12 (1970) 369
53. Gustafsson, J.-A., Lisboa, B.P. Steroids
14 (1969) 659
54. Jacobson, M., Levin, W.,
Kuntzman, R. Biochem.Pharmacol.
18 (1969) 2253
55. Gustafsson, J.-A., Lisboa, B.P. Acta Endocr.
65 (1970) 84
56. Gustafsson, J.-A., Lisboa, B.P.,
Sjövall, J. Eur.J.Biochem.
6 (1968) 317
57. Demisch, K., Staib, W. Eur.J.Biochem.
7 (1969) 324
58. Ford, H.C., Wheeler, R.,
Engel, L.L. Eur.J.Biochem.
57 (1975) 9
59. Lisboa, P.B., Gustafsson, J.-A. Acta Endocr.
138 (1969) 62

60. Lisboa, B.P., Plasse, J.-C. Steroids Lipids Res.
3 (1972) 142
61. Farnsworth, W.E., Brown, J.R. Nat.Cancer Inst.Monograph
12 (1963) 323
62. Inano, H., Tamaoki, B. Biochemistry
10 (1971) 1503
63. Inano, H., Tsuno, K., Tamaoki, B. Biochemistry
9 (1970) 2253
64. Eechaute, W., Lacroix, E., Leusen, I. Steroids
24 (1974) 753
65. Schriefers, H., Hoff, H.-G., Ghraf, R., Ockenfels, H. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
352 (1971) 1363
66. Anderson, K.M., Liao, S. Nature
219 (1968) 277
67. Wilson, J.D., Gloyna, R.E. Recent Progr.Hormone Res.
26 (1970) 309
68. Zanisi, M., Motta, M., Martini, L. J.Endocrinology
56 (1973) 315
69. Robel, P., Lasnitzki, I., Baulieu, E.E. Biochimie
53 (1971) 81
70. Massa, R., Martini, L. J.Steroid Biochem.
5 (1974) 941
71. Baulieu, E.E., Lasnitzki, I., Robel, P. Nature
219 (1968) 1155
72. Tamm, J., Voigt, K.D. Schweiz.Med.Wschr.
101 (1971) 1078
73. Massa, R., Martini, L. Gynec.Invest.
2 (1971/72) 253
74. Fang, S., Anderson, K.M., Liao, S. J.Biol.Chem.
244 (1969) 6584
75. Wenzel, M., Kleucker, H., Schulze, P.E. Z.Naturforschung
21b (1966) 1178
76. Wenzel, M., Köster, G., Hönicke, J. Z.Klin.Chem.Klin.Bioch.
8 (1970) 231
77. Wenzel, M., Bangert, I. Klin.Wschr.
45 (1967) 1160
78. Wenzel, M., Pitzel, L., Schulze, P.E. Angew.Chem.
80 (1968) 191
79. Wenzel, M. in "Prinzip der Stoff-
wechsellabilen Tritium-
Markierung"
Ber.d.Jahrestagung Ges.f.
Nuklearmedizin, Zürich
(1969) Schattauer Verlag

80. Wenzel, M. Biochem.Pharmacol.
20 (1971) 2531
81. Ryan, K.J., Engel, L.L. J.Biol.Chem.
225 (1957) 103
82. Wenzel, M. unveröffentlicht (1975)
83. Simon, H., Palm, D. Angew.Chem.
22 (1966) 993
84. The Radiochemical Centre
(Fa.Amersham/Buckinghamshire) Firmenmitteilung
Nr. 3 (1975)
85. Wenzel, M., Pitzel, L.,
Bollert, B. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
353 (1972) 861
86. Evans, E. in "Tritium and its
Compounds
London, Butterworths (1966)
87. Pitzel, L. J.Labelled Comp.
9 (1973) 57
88. Abul-Hajj, Y.J. J.Labelled Comp.
7 (1971) 33
89. Griffiths, K. J.Endocrinology
26 (1963) 445
90. Jenkins, J.S., Meakin, J.W.,
Nelson, D.H., Thorn, G.W. Science
128 (1958) 478
91. Kahnt, F.W., Neher, R. Experientia
18 (1962) 499
92. Kraulis, J., Birmingham, M.K. Fed.Proc.
22 (1963) 530
93. Hoffmann, W., Breuer, H.,
Neumann, F. Arzeinmittel Forschung
18 (1968) 586
94. Fishman, J., Geller, J. Steroids
16 (1970) 351
95. Conney, A., Klutch. A. J.Biol.Chem.
238 (1963) 1611
96. Abraham, R., Staudinger, H. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
346 (1966) 198
97. Golf, S.W., Graef, V.,
Staudinger, H. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
355 (1974) 1499
98. Conney, A.H., Schneidmann, K.,
Jacobsen, M., Breuer, H. Ann.New York Acad.
123 (1965) 98
99. Peron, F.G., Dorfman, R.I. Endocrinology
62 (1958) 1
100. Burstein, S., Bharnani, B.R.,
Gut, M. J.Biol.Chem.
240 (1965) 2845

101. Gram, T.E. in "Drug Metabolism Review", Herausgeber F.J. Di Carlo 2 (1974) M.Dekker, Inc., New York
102. Nicholas, T.E., Kim, P.A. Steroids 25 (1975) 387
103. Schriefers, H., Ghraf, R., Hoff, H.-G., Ockenfels, H. Acta Endocr. 69 (1972) 789
104. Schmidt, H., Szalay, R., Voigt, K.D. Acta Endocr. 177 (1973) 64
105. Stern, J.M., Eisenfeld, A.J. Endocrinology 88 (1971) 1117
106. Hoffmann, W., Breuer, H. Acta Endocr. 57 (1968) 623
107. Hoffmann, W., Breuer, H. Arzneimittel Forschung 18 (1968) 586
108. Smuckler, E.A. Biochem.Biophys. Res.Comm. 5 (1961) 270
109. Plaa, G.L., Larson, R.E. Environmental Health 9 (1964) 536
110. Sasame, H.A., Castro, J.A., Gillette, J.R. Biochem.Pharmacol. 17 (1968) 1759
111. Ringold, J.H., Ramachandran, S. Forchielli, E. Biochim.Biophys.Acta 82 (1964) 143
112. McGuire, J., Tomkins, G.M. Fed.Proc. 19 (1961) 29
113. Abul-Hajj, Y.J. Steroids 20 (1972) 215
114. Björkhem, I., Danielsson, H. Eur.J.Biochem. 12 (1970) 80
115. Berseus, O., Björkhem, I. Eur.J.Biochem. 2 (1967) 503
116. Schriefers, H., Wassmuth, E. Lauffs, K. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 350 (1969) 183
117. Wenzel, M., Wolf, S. Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 350 (1969) 1203
118. Bergmeyer, H.U. Methoden der enzymatischen Analyse Band II (1974) 1241
119. Umbreit, W., Burris, R.H. Stauffer, J.E. Manometric Techniques, Burgers, Minneapolis, (1959) 149

120. Gomori, G. Proc.Soc.Exp.Biol. (N.Y.)
68 (1948) 354
121. Wright, R.S. J.Chromatogr.
59 (1971) 220
122. Simon, H. (Herausgeber) Messung von radioaktiven
und stabilen Isotopen (1974
Springer Verlag Berlin
123. Pace, N., Rathbun, E. J.Biol.Chem.
158 (1945) 667
124. Esselborn, R., Katzenmeyer, W. Firmenzeitschrift E. Merck
Kontakte
3 (1974) 3
125. Greene, E.E., Stripp, B., Biochem.Pharmacol.
Gillette, J.R. 18 (1969) 1531
126. Levin, W., Welch, R., J.Pharmacol.Exp.Ther.
Conney, A.H. 146 (1964) 280
127. Wenzel, M. Biochem.Pharmacol.
20 (1971) 2531
128. van Cantfort, J., Renison, J., Eur.J.Biochem.
Gielen, J. 55 (1975) 23
129. van Cantfort, J., Gielen, J. Eur.J.Biochem.
55 (1975) 33
130. Bardin, W., Peterson, R. Endocrinology
80 (1967) 38
131. Remmer, H., Siegert, M. Arch.Exp.Path.Pharm.
247 (1964) 522
132. Ghraf, R., Lax, E.R., Acta Endocr.
Schriefers, H. 71 (1972) 781
133. Hoff, H.-G., Ghraf, R., Hoppe-Seyler's
Raible, M., Schriefers, H. Z.Physiol.Chem.
354 (1973) 306
134. Bolt, H.M., Kappus, H., J.Clin.End.Metab.
Käsbohrer, R. 39 (1974) 1072
135. Wickramasinghe, R.H. Steroids Lipids Res.
4 (1973) 143
136. Klingenberg, M. in "Zur Bedeutung der
freien Nucleotide" (1961)
Springer Verlag, Berlin -
Heidelberg - New York
137. Jensen, E.V., Jacobson, H.J. Biol.Activ.of Steroids in
Relation to Cancer
Academic Press (1960) 161
138. Jensen, E.V., Jacobson, H.J. Rec.Progr.Horm.Res.
18 (1962) 387

139. Williamso, D.H., Mayor, F.,
Veloso, D. in "Regulation of Gluco-
neogenesis" (1971) 96
H.D. Söling und B. Willms
(Herausgeber)
140. Wenzel, M., Pitzel, L.,
Rießelmann, B. Hoppe-Seyler's
Z.Physiol.Chem.
356 (1975) 459
141. Ghraf, R., Lax, E.R.,
Schriefers, H. Acta Endocr.
71 (1972) 781
142. Jacobson, M., Kuntzmann, R. Steroids
13 (1969) 327
143. Ghraf, R., Lax, E.R.,
Hoff, H.-G., Schriefers, H. Acta Endocr.
77 (1974) 287
144. Stern, J.M., Eisenfeld, A. Science
166 (1969) 233
145. Tveter, K.J., Acta Endocr.
66 (1971) 352
146. Gibb, J.W., Brody, T.M. Biochem.Pharmacol.
16 (1967) 2047
147. Slater, T.F., Sawyer, B.C.,
Sträuli, U.D. Biochem.J.
93 (1964b) 260

LEBENS LAUF

Geburtsdatum: 10. Oktober 1945

Geburtsort: Poschetzau Kreis Karlsbad

Eltern: Senatspräsident Karl-Josef Hoffrichter und
Werklehrerin Dorothea Hoffrichter geb. Pleier

Familienstand: seit März 1974 verheiratet mit Dr.-Ing.
Wilfried Lemm

Schulbildung: 1952 bis 1956 Volksschule in Billerbeck/Westf.
1956 bis 1958 Städt. Realschule in Billerbeck
1958 bis 1959 Annette von Droste-Hülshoff
Schule in Münster/Westf.
1959 bis 1965 Neusprachliches Mädchengymnasium
in Velbert/Rhld.

Reifeprüfung: 24. Februar 1965 in Velbert

Pharmazeutisches
Praktikum: 1965 bis 1967 Rats-Apotheke in Velbert

Pharmazeutische
Vorprüfung: 3. März 1967 in Düsseldorf

Studium: Sommersemester 1968 bis Wintersemester 1968/69
Technische Universität Berlin
Sommersemester 1969 bis Wintersemester 1970/71
Freie Universität Berlin

Staatsexamen: 20. April 1971 in Berlin

Approbation: 28. Oktober 1971

Assistenten-
tätigkeit: seit 1. April 1972 Wissenschaftliche Assistentin
am Pharmazeutischen Institut der Freien Univer-
sität Berlin. Gleichzeitig Beginn der vorliegen-
den Promotionsarbeit unter Anleitung von Herrn
Prof. Dr. M. Wenzel

Akademische Lehrer waren die Professoren: F. Eiden, H. Fenner,
K.-H. Frömming, R. Hänsel, A. Kreutzberger,
R. Maurer, H. Möhrle, M. Wenzel

